

**Einfluss von Omega-3 Fettsäuren auf die Bildung  
physiologisch aktiver CYP-Eicosanoide**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Humanbiologin Anne Konkel

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Herrmann  
2. PD Dr. Dominik N. Müller  
3. PD Dr. Ralph Menzel

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2014



# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 n-3 Fettsäuren und deren Bedeutung bei kardiovaskulären Erkrankungen .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Molekulare Mechanismen der Effekte von n-3 PUFAs .....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Freisetzung von PUFAs aus Membranphospholipiden und Bildung von Eicosanoiden.....	7
1.2.2 Physiologische Bedeutung n-3 abgeleiteter Eicosanoide.....	8
<b>1.3 Bildung und Wirkung von CYP-Eicosanoiden .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Physiologische Bedeutung von CYP-Eicosanoiden im Herzen.....</b>	<b>12</b>
<b>1.5 Zelluläre Mechanismen von CYP-Eicosanoiden.....</b>	<b>15</b>
<b>1.6 Mögliche Rolle von Rezeptoren in der Vermittlung von CYP-Eicosanoideffekten.</b>	<b>15</b>
<b>1.7 Zielsetzung .....</b>	<b>19</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Verwendete Materialien und Chemikalien .....</b>	<b>20</b>
2.1.1 Chemikalien .....	20
2.1.2 PCR-Primer .....	20
2.1.3 TaqMan-Primer.....	21
2.1.4 Plasmide.....	21
2.1.5 DNA- und Protein-Marker .....	21
2.1.6 Antikörper .....	21
2.1.7 Fluorochrome .....	22
2.1.8 Enzyme.....	22
2.1.9 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten.....	22
2.1.10 Puffer und Lösungen für mikro- und zellbiologische Arbeiten .....	23
2.1.11 Puffer und Lösungen für Proteinbiochemie.....	24
2.1.12 Puffer und Lösungen für Membranfärbung.....	25
2.1.13 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz.....	25
2.1.14 Zelllinien .....	25
2.1.15 Kits.....	26

2.1.16	Geräte .....	26
2.1.17	Software .....	26
<b>2.2</b>	<b>Methoden zur klinischen Studie .....</b>	<b>28</b>
2.2.1	Studiendesign.....	28
2.2.2	Aufarbeitung und Messung der Proben .....	28
2.2.3	Definition von Omega-3 Index und CYP-Eicosanoid-Index.....	29
2.2.4	Messung klinischer Risikofaktoren.....	29
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische und gentechnische Methoden.....</b>	<b>30</b>
2.3.1	RNA-Isolation.....	30
2.3.2	cDNA-Synthese .....	30
2.3.3	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	30
2.3.4	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) .....	31
2.3.5	Restriktionsverdau.....	31
2.3.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	31
2.3.7	DNA-Gelextraktion.....	31
2.3.8	Ligation .....	32
2.3.9	Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen mittels Elektroporation.....	32
2.3.10	Plasmidpräparation nach der CTAB-Methode.....	32
2.3.11	Bestimmung von Quantität und Qualität isolierter DNA.....	33
2.3.12	Plasmidpräparation für eine Transfektion.....	33
2.3.13	Sequenzierung.....	33
2.3.14	Klonierung des Rezeptorkandidaten GPR22 .....	33
2.3.15	Codon-Optimierung .....	34
2.3.16	Anbringen einer Melittinsignalsequenz an GPRopt-Sequenz .....	34
2.3.17	Einbringen eines 6x HisTags in die GPRopt-Sequenz.....	36
2.3.18	Umklonierung von modifiziertem GPRopt in pcDNA 3.1(-) und pOET2.....	37
<b>2.4</b>	<b>Mikro- und zellbiologische Arbeiten.....</b>	<b>38</b>
2.4.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	38
2.4.2	Kultivierung von Sf9-Zellen .....	39
2.4.3	Herstellung rekombinanter GPRopt/Baculoviren.....	39
2.4.4	Bestimmung des Titters der rekombinanten GPRopt/Baculoviren.....	40
2.4.5	Heterologe Expression der GPRopt/Baculoviren in Sf9-Zellen .....	40
2.4.6	Kultivierung von HEK293 Zellen.....	41
2.4.7	Heterologe Expression von GPRopt in HEK293 Zellen .....	41
<b>2.5</b>	<b>Herstellung Peptid-spezifischer Antikörper .....</b>	<b>41</b>
<b>2.6</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>42</b>
2.6.1	Proteinaufarbeitung für Western blot .....	42
2.6.2	Proteinbestimmung nach Lowry .....	43
2.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	43
2.6.4	Western Blot.....	43
2.6.5	Beschichtung von Deckgläschen.....	44
2.6.6	Plasmamembranfärbung .....	44
2.6.7	Immunzytochemie .....	45

<b>2.7</b>	<b>Mikroskopie .....</b>	<b>45</b>
<b>2.8</b>	<b>Bioassay mit neonatalen Rattenkardiomyozyten.....</b>	<b>46</b>
<b>2.9</b>	<b>Ligandenbindungstests .....</b>	<b>48</b>
2.9.1	Chemische Epoxidation von <sup>3</sup> H-Arachidonsäure .....	48
2.9.2	Gewinnung von <sup>3</sup> H-14,15-EET Enantiomeren mittels HPLC .....	49
2.9.3	Bindungstests.....	49
<b>2.10</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>50</b>
2.10.1	Statistische Auswertung für die klinische Studie .....	50
2.10.2	Statistische Auswertung der Δ Kontraktion/min in NRKMs .....	51
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
<b>3.1</b>	<b>Einfluss von omega-3 Fettsäuren auf das endogene CYP-Eicosanoidprofil .....</b>	<b>52</b>
3.1.1	Basale Charakterisierung der Probanden .....	52
3.1.2	Veränderung der endogenen Fettsäurezusammensetzung nach Omacor®- Gabe.....	53
3.1.3	Veränderung des endogenen CYP-Eicosanoidprofils nach Omacor®-Gabe .....	56
3.1.4	Veränderung des endogenen COX- und LOX-Eicosanoidprofils nach Omacor®-Gabe .	61
3.1.5	Einfluss der Omacor®-Gabe auf klinische Risikofaktoren.....	64
<b>3.2</b>	<b>Anti-arrhythmischer Effekt von EPA, dem CYP-abhängigen Epoxymetabolit 17,18-EEQ und synthetischen 17,18-EEQ-Analoga im Zellmodell .....</b>	<b>66</b>
3.2.1	17,18-EEQ wirkt in gleicher Weise wie die Vorläuferfettsäure EPA auf die Kontraktilität von NRKMs .....	66
3.2.2	Strukturfunktionsanalyse.....	68
3.2.3	EPA, 17,18-EEQ und ein synthetischer Agonist aktivieren gleiche Signalwege.....	72
<b>3.3</b>	<b>Identifizierung eines Rezeptorkandidaten für den 17,18-EEQ-Effekt auf NRKMs. 74</b>	
3.3.1	Rolle von Gαi-Proteinen in der Vermittlung des 17,18-EEQ-Effekts auf NRKMs .....	74
3.3.2	Auswahl eines Rezeptorkandidaten .....	76
3.3.3	Expressionsprofil des Rezeptorkandidaten .....	77
3.3.4	GPR22 als Vermittler der Wirkung von 17,18-EEQ .....	78
<b>3.4</b>	<b>Klonierung und Expression des potenziellen Rezeptors in Säuger- und Insektenzellen .....</b>	<b>79</b>
3.4.1	Klonierung.....	80
3.4.2	Expression des GPR22-Rezeptors in Sf9-Insektenzellen.....	84
3.4.3	Expression des GPR22-Rezeptors in HEK293-Säugerzellen.....	89
3.4.4	Ligandenbindungstests.....	94
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>98</b>
<b>4.1</b>	<b>Beeinflussung der Fettsäurezusammensetzung und des endogenen CYP-Eicosanoidprofils durch EPA/DHA-Supplementation im Menschen .....</b>	<b>98</b>
4.1.1	Effekt der Omacor®-Gabe auf die Fettsäurezusammensetzung .....	98

4.1.2	Effekt der Omacor®-Gabe auf n-3 PUFA abgeleitete Metabolite .....	102
<b>4.2</b>	<b>Anti-arrhythmische Effekte von EPA, 17,18-EEQ und synthetischen Analoga .....</b>	<b>111</b>
4.2.1	17,18-EEQ als Vermittler der anti-arrhythmischen Effekte von EPA .....	111
4.2.2	Identifikation struktureller Voraussetzungen für die 17,18-EEQ Wirkung .....	112
<b>4.3</b>	<b>Identifizierung eines 17,18-EEQ Rezeptors .....</b>	<b>116</b>
4.3.1	Suche eines potentiellen Rezeptorkandidaten .....	116
4.3.2	Mögliche physiologische Bedeutung von GPR22 im kardiovaskulären System .....	118
4.3.3	Erste Schritte zur Validierung der Rezeptorfunktion .....	121
<b>5</b>	<b>LIMITATIONEN UND AUSBLICK .....</b>	<b>125</b>
5.1.1	Ligandenbindungsstudien .....	125
5.1.2	Rezeptorcharakterisierung .....	125
5.1.3	Identifizierung verschiedener Signalkomponenten .....	127
5.1.4	KO-Maus-Modell .....	127
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>		<b>128</b>
<b>APPENDIX .....</b>		<b>144</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>		<b>147</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>		<b>149</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>		<b>151</b>
<b>PUBLIKATIONEN .....</b>		<b>152</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>		<b>154</b>
<b>EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>		<b>155</b>

## **Zusammenfassung**

Hintergrund der vorliegenden Arbeit ist die Beobachtung, dass n-3 mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs), wie insbesondere die in marinem Fisch enthaltene Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA), vor kardiovaskulären Erkrankungen und Arrhythmien schützen. Weiterhin ist aus *in vitro* Untersuchungen bekannt, dass rekombinante Cytochrom P450 (CYP) Enzyme nicht nur die physiologisch bedeutsamste n-6 PUFA Arachidonsäure (AA), sondern auch die n-3 PUFAs EPA und DHA als alternative Substrate verwenden. Dabei werden die PUFAs zu einer Reihe von bioaktiven regio- und stereoisomeren Epoxy- und Hydroxymetaboliten, den CYP-Eicosanoiden, umgesetzt. CYP-Eicosanoide fungieren als sekundäre Botenstoffe bei der Regulation von Gefäß-, Nieren- und Herzfunktionen. Die genauen molekularen Mechanismen dieser Metabolite sind noch weitgehend unerforscht. Vor diesem Hintergrund ergaben sich die drei wesentlichen Fragestellungen dieser Arbeit.

### **1. Ernährungsbedingter Einfluss auf das endogene CYP-Eicosanoidprofil**

Aufgrund des Befundes, dass CYP-Enzyme *in vitro* n-3 PUFAs als alternative Substrate verwenden, wurde angenommen, dass über die Ernährung aufgenommene n-3 PUFAs das endogene CYP-Eicosanoidprofil modulieren. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe mit Ratten zeigten tatsächlich eine Verschiebung des CYP-Eicosanoidprofils nach EPA/DHA-Supplementation hin zu den n-3 PUFA abgeleiteten Metaboliten in verschiedenen Geweben bzw. Organen. Über die endogene Bildung von EPA/DHA-abgeleiteten CYP-Eicosanoide im Menschen ist jedoch noch wenig bekannt. Daraus abgeleitet war das erste Ziel der vorliegenden Arbeit zu zeigen, dass auch im Menschen die CYP-Eicosanoidbildung von der Verfügbarkeit der Vorläuferfettsäuren abhängt. Um den Einfluss von n-3 PUFAs auf das endogene CYP-Eicosanoidprofil im Menschen zu untersuchen, wurde eine klinische Studie mit 20 gesunden Teilnehmern durchgeführt. Die Ergebnisse der Arbeit zeigten, dass mit Gabe von Omacor® (EPA/DHA-Supplementation) sowohl im Plasma als auch im Urin die n-3 PUFA abgeleiteten Metabolite signifikant anstiegen. Besonders trat dabei der EPA-Metabolit 17,18-EEQ hervor. EPA und DHA schienen im Vergleich zu AA mit höherer Effektivität zu ihren entsprechenden Epoxymetaboliten umgesetzt zu werden.

### **2. Anti-arrhythmische Wirkung von n-3 PUFA abgeleiteten CYP-Eicosanoiden**

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Fragestellung nachgegangen, ob möglicherweise die von n-3 PUFAs abgeleiteten CYP-Eicosanoide die eigentlichen Vermittler der kardioprotektiven Wirkung von n-3 PUFAs sind. Zur Untersuchung antiarrhythmischer Effekte des von EPA abgeleiteten CYP-Epoxyeicosanoids 17,18-Epoxyeicosatetraensäure (17,18-EEQ) wurde ein etabliertes Zellmodell mit spontan schlagenden neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRKMs) verwendet. Mit den NRKMs wurde gezeigt, dass der negativ chronotrope Effekt von EPA tatsächlich durch 17,18-EEQ vermittelt wurde, wobei nur das R,S-Enantiomer (17(R),18(S)-EEQ) wirksam war. Zudem wurden mittels Strukturfunktionsanalyse synthetische Analoga gefunden, die die gleiche Wirksamkeit wie 17,18-EEQ aufwiesen. Dabei wurde deutlich, dass folgende strikte strukturelle Merkmale für die agonistische Funktion von Bedeutung waren: (i) eine Doppelbindung in 11,12-Position, sowie (ii) eine Sauerstofffunktion in 17,18-Position, die (iii) in R,S-Konfiguration vorliegen musste. Die strikten strukturellen Merkmale und die schnelle Wirkung von 17,18-EEQ und den synthetischen Analoga ließen eine spezifische Wechselwirkung mit zellulären Zielstrukturen, wie z.B. Rezeptoren, vermuten.

Zunächst wurde durch pharmakologische Intervention mit Pertussistoxin die Rolle von Gai-Protein gekoppelten Rezeptoren in der Vermittlung des 17,18-EEQ-Effekts in NRKMs untersucht. Da der 17,18-EEQ-Effekt nach Pertussistoxinbehandlung ausfiel, war zu vermuten, dass dieser Effekt tatsächlich über die Aktivierung von Gai-Protein gekoppelten Rezeptoren vermittelt ist.

### **3. Identifizierung eines molekularen Ziels für CYP-Eicosanoide**

Daraus ergab sich als weiteres Ziel der Arbeit die Identifizierung eines Rezeptors als mögliche Zielstruktur für n-3 PUFA abgeleitete CYP-Eicosanoide. Aus einer ermittelten Liste von möglichen Kandidaten wurde ein Kandidat für weiterführende Versuche ausgewählt. Als möglicher Rezeptorkandidat wurde GPR22 vermutet, da er u.a. im humanen und murinen Herzen sowie in NRKMs exprimiert ist. Eine verminderte GPR22-Expression in NRKMs führte zur Aufhebung des 17,18-EEQ Effekts. Zur Verifizierung der Rezeptorfunktion wurde GPR22 in Insekten- und Säugerzellen heterolog exprimiert. Zuvor wurde für eine verbesserte Expression die GPR22-Sequenz Codon-optimiert und N-terminal eine Signalsequenz (Melittin) sowie C-terminal ein 6x HisTag in die Sequenz eingefügt. In ersten Versuchen zur Bindungskapazität des Rezeptors von CYP-Epoxyeicosanoiden konnte gezeigt werden, dass GPR22-exprimierende Zellen wesentlich mehr radioaktiven Ligand ( $[^3\text{H}]$ -14,15-EET) gebunden hatten als die Kontrollzellen. Diese Bindung konnte durch



Zugabe von 100 nM des potentiellen endogenen Liganden 17,18-EEQ verdrängt werden.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass n-3 PUFAs auch *in vivo* alternative Substrate von CYP-Enzymen darstellen und bei entsprechender Verfügbarkeit sogar effektiver zu ihren Metaboliten umgesetzt wurden als AA. Als ein wichtiger Metabolit entsteht nach EPA/DHA-Supplementation 17,18-EEQ, welcher womöglich der eigentliche Vermittler der kardioprotektiven Effekte von n-3 PUFAs ist. Die Suche nach einem molekularen Ziel für CYP-Epoxyeicosanoide führte zu einem möglichen Rezeptorkandidaten, der hinsichtlich seiner Ligandenspezifität untersucht wurde. Sollten sich die Ergebnisse der Ligandenbindungsversuche in zukünftigen Versuchen bestätigen, stellt der ermittelte Rezeptorkandidat ein mögliches neues zelluläres Ziel zur Behandlung kardialer Arrhythmien dar. Dieser Rezeptor wäre zudem der Erste, der für die Klasse der CYP-Eicosanoide identifiziert werden konnte.

## Abstract

The n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), as found in fatty fish, protect from cardiovascular disease, especially from fetal arrhythmia. Moreover, it is known from *in vitro* studies that recombinant cytochrome P450 (CYP) enzymes not only accept the physiologically most important n-6 PUFA arachidonic acid (AA), but also EPA and DHA as alternative substrates. Thereby, CYP enzymes generate regio- and stereospecific a series of biologically active epoxy- and hydroxymetabolites, the so-called CYP-eicosanoids. These CYP-dependent eicosanoids serve as second messengers regulating vascular, renal and cardiac function. The precise underlying molecular mechanisms are only partially understood and need further investigation. Hence, the three major objectives for the thesis were derived.

### **1. Dietary changes in the endogenous CYP-eicosanoid profile**

Due to the finding, that CYP-enzymes use n-3 PUFAs as alternative substrates *in vitro*, it was assumed, that dietary n-3 PUFA-supplementation modulates the endogenous CYP-eicosanoid profile. Previous work of the group showed, that EPA/DHA-supplementation led to a substantial replacement of AA by EPA and DHA in rats, which was accompanied by a shift in the endogenous CYP-eicosanoid profile towards EPA- and DHA-derived metabolites. However, little is known about the formation of EPA- and DHA-dependent CYP-eicosanoids in men. Therefore, the first aim of the thesis was to show that the endogenous CYP-eicosanoid profile depends on the availability of the precursor fatty acids. To test this hypothesis a clinical trial with 20 healthy volunteers was performed. The results showed, that after EPA/DHA-supplementation there was a significant increase in n-3 PUFA derived metabolites measured in plasma and urine. Interestingly, 17,18-EEQ, an EPA-derived CYP-epoxymetabolite, predominated, compared to the corresponding AA- or DHA-derived metabolites. Moreover, the obtained metabolite/precursor fatty acid ratios indicate that EPA and DHA were metabolized via the CYP-epoxygenase pathway with a higher efficiency than AA.

### **2. Anti-arrhythmic effect of n-3 PUFA derived CYP-eicosanoids**

The second major objective of the thesis dealt with the question if n-3 PUFA derived CYP-eicosanoids are the actual mediators of cardioprotective effects originally attributed to n-3 PUFAs. To test the anti-arrhythmic effect of EPA and its CYP-dependent epoxymetabolite 17,18-EEQ, an established cell model with neonatal rat cardiomyocytes (NRKMs) was used. In this bioassay it was shown, that the negative chronotropic effect of EPA was mimicked by 17,18-EEQ, whereas only the R,S-

enantiomer of 17,18-EEQ was active. With the help of a structure activity relationship study synthetic analogs were found, exerting the same biological effect as 17,18-EEQ. Moreover, the following strict structural requirements were found for agonistic function: (i) a double bond in 11,12-position, (ii) an oxygen functionality in 17,18-position, which (iii) needed to be in R,S-configuration. Due to the strict structural requirements and an immediate effect of 17,18-EEQ and the synthetic analogs, a specific interaction with cellular targets, like membrane-associated receptors, was assumed. Following this idea, the role of G $\alpha$ i-proteins in mediating the 17,18-EEQ effect was investigated by preincubating NRKMs with pertussistoxin. Since the 17,18-EEQ effect on NRKMs was abolished with pertussistoxin treatment, a G $\alpha$ i-protein mediated mechanism was assumed.

### **3. Identification of a molecular target for CYP-eicosanoids**

Thus, the third objective of the thesis was the identification of a potential receptor as a molecular target for n-3 PUFA derived CYP-eicosanoids. Of the long orphan receptor list in question, GPR22 was chosen as a potential candidate. GPR22-expression was found in human and murine heart tissue as well as in NRKMs. Knockdown of GPR22 in NRKMs abolished the 17,18-EEQ effect indicating the physiological importance of this receptor. For verification of the GPR22 receptor function, GPR22 was heterologously expressed in insect and mammalian cells. Beforehand, the GPR22-sequence was codon optimized and a signal sequence at the N-terminus and a 6x HisTag at the C-terminus were added for improved expression. In preliminary competition assays on the binding capacity of GPR22 for CYP-eicosanoids it was shown, that the receptor expressing cells had bound much more radioactive ligand ([ $^3$ H]-14,15-EET) than the control cells. This binding was repressed by addition of the putative endogenous ligand 17,18-EEQ.

In summary, the results show that n-3 PUFAs serve also *in vivo* as alternative CYP-dependent substrates and are even preferentially metabolized compared to AA. After EPA/DHA-supplementation 17,18-EEQ was generated as a major metabolite, which might be an important mediator of cardiovascular effects originally attributed to n-3 PUFAs. The search of a molecular target of CYP-eicosanoids led to a putative receptor, which was tested for ligand binding specificity. If the preliminary results on the ligand binding are confirmed in future experiments this receptor might be a novel target for the treatment of cardiac arrhythmia. Moreover, GPR22 would be the first receptor in the class of CYP-eicosanoids to be identified.

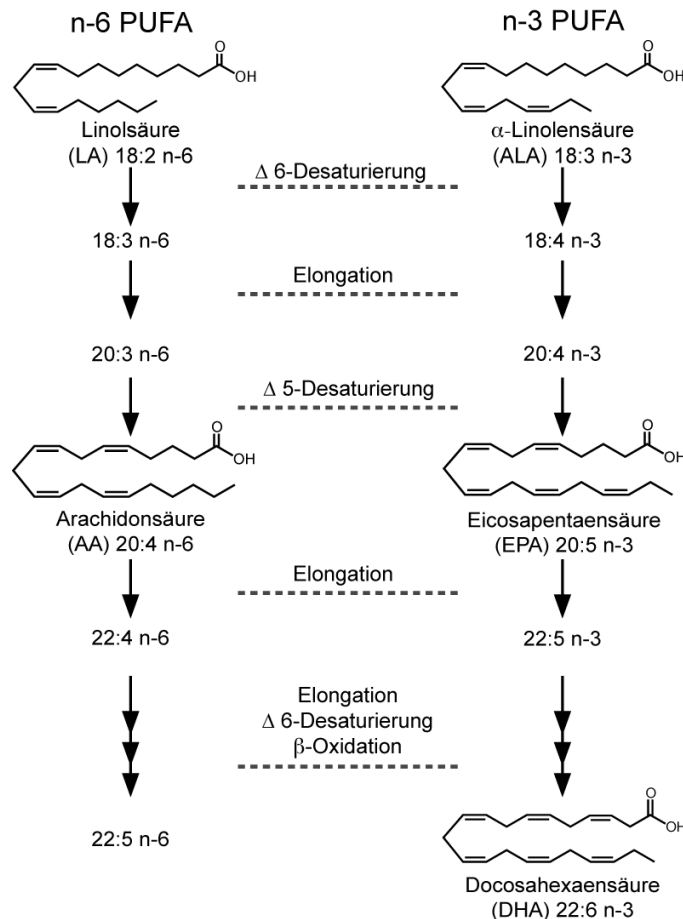


# 1 Einleitung

## 1.1 n-3 Fettsäuren und deren Bedeutung bei kardiovaskulären Erkrankungen

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs; *polyunsaturated fatty acids*) sind für die menschliche Gesundheit essentielle Bestandteile der Nahrung. Die Klassifizierung der PUFAs erfolgt aufgrund der Länge der vom Methylen der Fettsäure (omega-C Atom) entfernten ersten Doppelbindung. Beginnt sie sechs C-Atome vom Methylen entfernt, spricht man von n-6 PUFAs und bei einer Entfernung von drei C-Atomen von n-3 PUFAs, Abbildung 1. Die n-6 Fettsäure (FS) Linolsäure (LA; C18:2 n-6) und n-3 PUFA  $\alpha$ -Linolensäure (ALA; C18:3 n-3) sind essentielle Fettsäuren, die über die Nahrung aufgenommen werden müssen, da für eine *de novo* Synthese in Säugern entsprechende Desaturasen zum Einfügen einer n-6 bzw. n-3 Doppelbindung nicht vorhanden sind. Prinzipiell können die in pflanzlichen Ölen, Nüssen und grünem Blattgemüse enthaltenden FS LA und ALA als Vorläufer für längerkettige PUFAs wie Arachidonsäure (AA; C20:4 n-6) bzw. Eicosapentaensäure (EPA; C20:5 n-3) und Docosahexaensäure (DHA; C22:6 n-3) dienen. Die Umwandlung durch Kettenverlängerung und Desaturierung von LA zu AA und ALA zu EPA und weiter zu DHA läuft in Säugern jedoch recht ineffizient ab [1-3]. Zudem sind n-6 und n-3 PUFAs aufgrund einer fehlenden n-3 Desaturase in Säugern nicht ineinander umwandelbar. Die Verfügbarkeit von AA, EPA und DHA im menschlichen Körper wird somit v.a. über die Nahrungsaufnahme bestimmt.

EPA und DHA, denen man eine kardioprotektive Wirkung zuspricht, kommen in besonders hohen Konzentrationen bei marinen Tieren wie fetten Fisch, Meereskrebsen und Meeressäugern vor. EPA und DHA werden ursprünglich von marinen Algen (Phytoplankton) synthetisiert und gelangen so in die Nahrungskette mariner Lebewesen. AA hingegen wird v.a. über tierische Nahrung aufgenommen. EPA und DHA können AA, die physiologisch bedeutsamste n-6 PUFA, partiell in Membranphospholipiden ersetzen [4, 5] und sind so mitbestimmend bei (patho-) physiologischen Prozessen im Körper.



**Abbildung 1: Biosyntheseweg langkettiger n-6 und n-3 PUFA in Säugern.**

LA kann als Vorläufer für AA dienen, wohingegen ALA als Vorläufer EPA bzw. DHA dient. Abbildung verändert nach [6].

Die in Fischöl enthaltenen n-3 PUFA EPA und DHA haben anti-inflammatorische, anti-thrombotische, vasodilatorische, Lipid senkende und anti-arrhythmische Eigenschaften und üben mit ihren pleiotropen Effekten schützende Wirkung auf das kardiovaskuläre System aus [7, 8], Tabelle 1. Die kardioprotektive Wirkung von n-3 PUFA ist schon lange bekannt. Erstmals wurde sie in den 1940er Jahren von dem britischen Wissenschaftler Hugh M. Sinclair, der epidemiologische Studien durchführte, beschrieben. Er untersuchte den Zusammenhang zwischen einem Mangel an essentiellen FS und der Entstehung von koronaren Herzerkrankungen. Dafür unternahm Sinclair Expeditionen zu in Kanada lebenden Inuit und nahm an, dass die Ernährung der Inuit Ursache für den Schutz vor Arteriosklerose und anderen „westlichen Krankheiten“ sei [9]. Spätere Expeditionen der dänischen Wissenschaftler Bang und Dyerberg zu auf Grönland lebenden Inuit bestätigten diesen Befund. Trotz fettreicher Ernährung wiesen die Inuit im Vergleich zu einer dänischen Kontrollgruppe eine sehr niedrige Inzidenz für die Mortalität aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen auf [10]. Dieser Umstand wird auch als „Eskimoparadox“ bezeichnet [10, 11]. Weitere vergleichende Studien der Ernährung von Inuit und Dänen zeigten,

dass der wesentliche Unterschied nicht in der Quantität der Fette, sondern in deren Qualität lag [10, 12, 13]. Bang und Dyerberg fanden heraus, dass bei den Inuit im Vergleich zu den Dänen n-6 PUFA durch n-3 PUFA (v.a. EPA) in den Serumlipiden ersetzt waren [12]. Zudem wiesen die Dänen im Vergleich zu den Inuit einen wesentlich höheren Anteil an gesättigten FS auf.

Auch neuere epidemiologische Studien zeigen, dass das Verhältnis der n-6 PUFA zu den n-3 PUFA von entscheidender Bedeutung für einen Schutz vor kardiovaskulären Erkrankungen sein kann. Ein Ungleichgewicht im n-6/n-3 PUFA-Verhältnis könnte somit beim Menschen schon in jungen Jahren zu einer beginnenden inflammatorischen Arteriosklerose führen [5]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass in älteren Menschen ein höherer Gehalt an zirkulierenden n-3 PUFA im Plasma mit einem geringeren Risiko für das Auftreten von Vorhofflimmern (*atrial fibrillation*, AF) assoziiert ist [14]. Es wird angenommen, dass das Verhältnis von n-6/n-3 in der Nahrung unserer Vorfahren bei 1:1 lag [15]. Eine „westliche Ernährung“ hingegen weist durch die reduzierte Aufnahme von n-3 PUFA ein zu den n-6 PUFA verschobenes Verhältnis auf, das bei 15-20:1 liegt.

Tierstudien belegen die kardioprotektive Wirkung von n-3 PUFA. So wurden in verschiedenen Tiermodellen für ventrikuläre Tachykardien [16-18] oder für AF [19, 20] starke anti-arrhythmische Effekte der n-3 PUFA beobachtet. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass n-3 PUFA in einem Rattenmodell für Angiotensin II-induzierten kardialen Schaden vor plötzlichem Herztod schützen [16]. Die für den Versuch verwendeten doppeltransgenen Ratten (dTGR), tragen die Gene für menschliches Renin und Angiotensinogen. Diese Tiere entwickeln unbehandelt neben schwerem Bluthochdruck, Hypertrophie, Entzündungen und Fibrosen auch kleine Herzinfarkte. Ventrikuläre Arrhythmien und ein plötzlich auftretender Herztod tragen zu einer hohen Sterblichkeit der dTGR-Tiere im Alter von bereits 7-8 Wochen bei. Im Gegensatz dazu starben die dTGR-Tiere nicht, wenn sie für drei Wochen mit entweder n-3 PUFA-Ethylestern mit Aliskiren (direkte Renininhibition) behandelt wurden. Trotz eines 70 mmHg Unterschiedes im Blutdruck und einer entwickelten Herzhypertrophie zwischen den Aliskiren- und den n-3 PUFA-behandelten Tieren, verbesserten n-3 PUFA elektrophysiologische Veränderungen, die Auslösbarkeit von Arrhythmien und erhielten die Expression von *gap-junction* Protein Connexin43 (Cx43) im ähnlichen Maße wie Aliskiren [16].

Um die anti-arrhythmischen Effekte von n-3 PUFA *in vitro* zu untersuchen, wurde von Kang und Leaf ein Zellmodell mit kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRKMs) etabliert [21, 22]. Das Zellmodell erlaubte die Beobachtung von n-3 PUFA

Effekten auf Kardiomyozyten in einem System, dass frei von hormonellen und neuronalen Einflüssen war. Mit Hilfe dieses Modells konnte gezeigt werden, dass EPA die spontane Schlagfrequenz der kultivierten Zellen reduzierte. EPA unterdrückte sogar die Antwort auf eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation oder eine erhöhte Calcium-Konzentration und hob unter diesen Bedingungen auftretende Arrhythmien auf [21, 23, 24].

Eine Vielzahl klinischer Studien zur primären oder sekundären Prävention kardiovaskulärer Ereignisse durch die Einnahme von n-3 PUFAs belegen eine Reduktion der Gesamtmortalität, des Auftretens eines plötzlichen Herztods oder Schlaganfalls [7, 8, 25-27]. Ursächlich dafür könnte ein n-3 PUFA-vermittelter Schutz der Patienten vor Herzkammerflimmern (*ventricular fibrillation*, VF) nach einem Myokardinfarkt (MI) oder Herzversagen sein [28, 29]. Eine sehr wichtige klinische Studie war die 1999 veröffentlichte Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardio (GISSI)-Prevenzione Studie. In dieser randomisierten Studie wurden 11.324 Patienten untersucht, die kürzlich einen MI erlitten hatten. Die Patienten wurden zufällig in vier gleichgroße Gruppen eingeteilt, um den Effekt von der täglichen Dosis von 1 g n-3 PUFAs (EPA+DHA), von 300 mg Vitamin E, oder n-3 PUFAs plus Vitamin E im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu beobachten [30]. Primäre Endpunkte der Studie waren: Tod, nicht-tödliche MIs und das Auftreten eines Schlaganfalls. Die Behandlung mit n-3 PUFAs, nicht aber mit Vitamin E reduzierte das Risiko der primären Endpunkte zu 15 % mit einer 20 %igen Reduktion eines generellen tödlichen Ereignisses und mit einer 45 %igen Reduktion eines plötzlichen Herztodes. Die Inzidenz nicht-tödlicher MIs reduzierte sich jedoch nicht signifikant [29].

In weiteren klinischen Studien zum Auftreten von AF nach einer Koronararterien-Bypassoperation wurde in einigen, aber nicht allen Studien, ein signifikanter antiarrhythmischer Effekt von n-3 PUFAs beobachtet [31-33]. Bei Patienten mit persistierender AF unterstützte die Gabe von n-3 PUFAs nach Kardioversion den Erhalt des Sinusrhythmus [34].

Neben vielen Positivstudien gibt es auch Negativstudien, v.a. aus einer Reihe von Metanalysen, die kürzlich veröffentlicht wurden [35, 36]. Teilweise widersprüchliche Ergebnisse sind wahrscheinlich auf eine Vielzahl von Faktoren zurückzuführen [37]. Design, Durchführung und Auswertung vieler Studien sind nicht einheitlich genug, um sie direkt miteinander vergleichen zu können. Ein wichtiger Punkt bei der Betrachtung der Studien ist auch die Medikation der Patienten. Nach neuesten Regularien für klinische Studien sind die Patienten bereits zu Studienbeginn optimal mit



Medikamenten wie Anti-Hypertensiva, Anti-Thrombotika oder Statinen eingestellt [38], sodass ein zusätzlicher Behandlungserfolg mit n-3 PUFAs nicht nachweisbar ist. In früheren Studien, bei denen ein eindeutiger anti-arrhythmischer Effekt der n-3 PUFAs schon bei geringen EPA/DHA-Dosen auftrat, wurden Patienten eingeschlossen, die z.B. keine Statine zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen erhalten haben. Statine inhibieren möglicherweise die von n-3 PUFAs ausgehenden protektiven Effekte [37]. Klinisch relevante unerwünschte Nebeneffekte von n-3 PUFAs sind bisher nicht bekannt [25, 37]. *In vitro* Untersuchungen zeigten eine n-3 PUFA-vermittelte signifikante Verlängerung der Blutungszeit [39]. Klinische Studien bestätigen diesen Befund [40], jedoch stellt es bei der Einnahme normaler diätischer Dosen kein Risiko dar [27].

Über die optimale n-3 PUFA Dosis, d.h. die endogene EPA/DHA-Konzentration zur Erreichung der gewünschten klinischen Effekte, wird derzeit noch diskutiert. Kürzlich veröffentlichte Studien stellen einen neu entwickelten Biomarker vor, den Omega-3 Index, mit dem die Bestimmung des aktuellen EPA/DHA-Status eines Patienten möglich ist [41, 42]. Der Omega-3 Index berechnet sich aus der Summe von EPA und DHA als prozentualer Anteil an den Gesamtfettsäuren in Erythrozyten. Der Omega-3 Index spiegelt den über die Nahrung aufgenommenen Gehalt an EPA+DHA im Herzen oder anderen Geweben wider und korreliert mit klinischen Ereignissen [43]. Untersuchungen zeigen, dass ein Omega-3 Index  $< 4\%$  mit einem 10-fach höherem Risiko für das Eintreten eines plötzlichen Herztods assoziiert ist, als im Vergleich zu einem Omega-3 Index  $> 8\%$  [42]. Abgeleitet von diesem Konzept ist eine n-3 Supplementation womöglich nur für n-3 defiziente Patienten protektiv, nicht aber für Patienten mit einem hohen Omega-3 Index, die aus anderen Gründen ein hohes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen tragen [44].

## 1.2 Molekulare Mechanismen der Effekte von n-3 PUFAs

Die anti-arrhythmischen, hypolipidämischen, anti-thrombotischen sowie andere physiologische Effekte treten in dosis- und zeitabhängiger Weise auf. Dies deutet auf mechanistische Unterschiede in der pleiotropen Wirkung von n-3 PUFAs hin [27, 45]. Die genauen molekularen Mechanismen der n-3 PUFA-Effekte sind noch weitgehend unbekannt, sie schließen aber Veränderungen in der Struktur von Membranen, der Genexpression, die direkte Interaktion mit Ionenkanälen oder Membranproteinen und eine modifizierte Eicosanoidbiosynthese mit ein [4, 46-50], Tabelle 1.

EPA, DHA und AA konkurrieren um den Einbau in Membranphospholipide und beeinflussen die Fluidität von Membranen bzw. die Anordnung von Mikrodomänen (*lipid rafts*) und damit auch die Funktion von membranständigen Proteinen (Ionenkanäle, Rezeptoren, Enzymen) sowie die Signaltransduktion der Zellen [47, 51-53]. Die in den Membranen enthaltenden Lipide ihrerseits können die Synthese diverser Eicosanoide oder anderer Lipidmediatoren beeinflussen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind [26]. Nicht-veresterte n-3 PUFAs interagieren mit Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) und anderen Transkriptionsfaktoren (z.B. SREBP-1c) und modulieren so die Genexpression [48]. Kürzlich wurde eine Reihe von Fettsäure-bindenden G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) entdeckt [54], die Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge binden können. Unter ihnen befindet sich der Rezeptor GPR120, der als erster n-3 PUFA bindender Rezeptor beschrieben wurde [55].

**Tabelle 1: Herzschützende Wirkung und mögliche Mechanismen von n-3 PUFAs.**

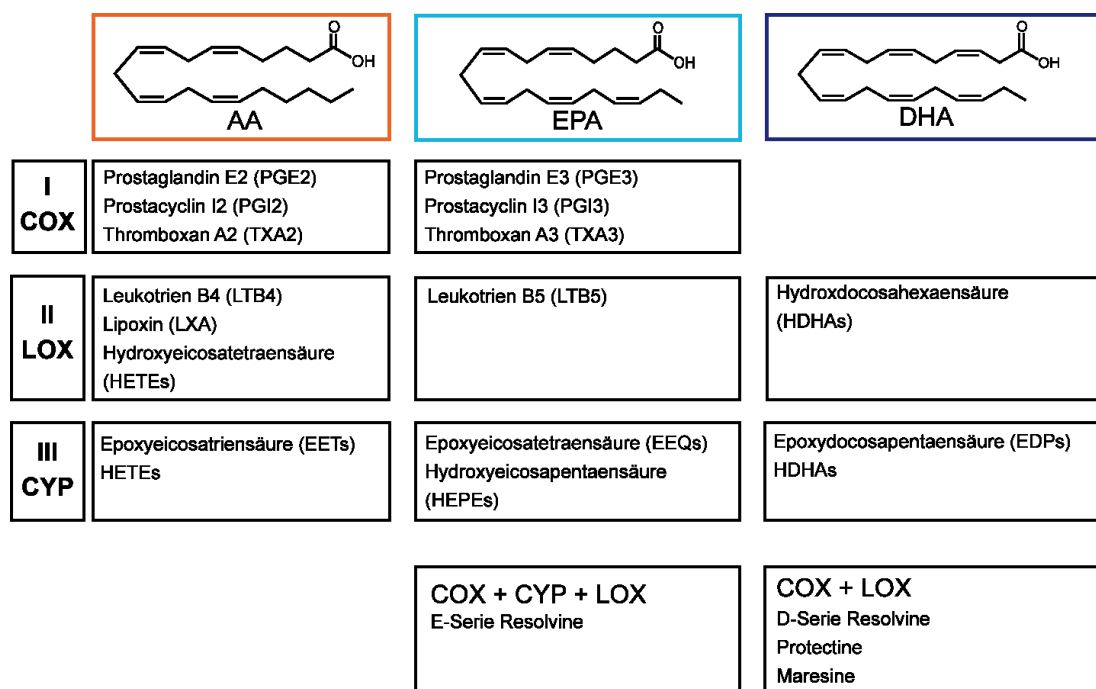
Tabelle abgeleitet aus [56].

<b>Klinische Effekte</b>	
Risikoreduktion für koronare Herzerkrankungen und Myokardinfarkt (MI)	[57]
Risikoreduktion für plötzlichen Herztod	[29]
Reduktion von Vorhofflimmern (AF)	[32, 34]
Verbesserung der linksventrikulären Funktion	[28]
<b>Physiologische Effekte</b>	
Anti-arrhythmisch	[21, 58, 59]
Anti-inflammatorisch	[8, 46, 49, 60]
Anti-atherogen (Plaquestabilisierung)	[42, 61]
Anti-thrombotisch	[39, 62]
Triglyzerid-senkend	[63-65]
Verbesserte Endothelfunktion	[7, 8, 66]
<b>Molekulare Effekte auf</b>	
Ionenkanäle	[8, 59]
Lipid raft Zusammensetzung und Signaltransduktion	[4, 47, 62]
Nukleäre Rezeptoren (PPARs), Transkriptionsfaktoren (SREBP)	[48]
Fettsäure bindende Rezeptoren	[54, 67, 68]
COX-, LOX- und CYP-abhängige Eicosanoidbiosynthese	[4]

### 1.2.1 Freisetzung von PUFAs aus Membranphospholipiden und Bildung von Eicosanoiden

Ähnlich wie AA werden EPA und DHA bevorzugt in der sn2-Position von Membranphospholipiden eingebaut [62, 69]. Nach Phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) vermittelter Freisetzung stehen die PUFAs zur Eicosanoidbiosynthese zur Verfügung. In den meisten Geweben induzieren extrazelluläre Stimuli (wie Stress, Ischämie, Hormone und Wachstumsfaktoren) die Aktivität der zytosolischen Calcium-abhängigen PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>α) und initiieren so die AA-Freisetzung. cPLA<sub>2</sub>α setzt EPA in gleichem Maße wie AA aus Phospholipiden frei [70], zeigt jedoch keine Aktivität in der Freisetzung von DHA [71]. Im Myokardium ist neben der Calcium-unabhängigen iPLA<sub>2</sub>γ die iPLA<sub>2</sub>β die vorherrschende PLA<sub>2</sub> [72]. iPLA<sub>2</sub>γ und iPLA<sub>2</sub>β setzen jeweils AA aus Plasmamembranen frei und sind vermutlich auch für die Freisetzung von EPA oder DHA im Herzen verantwortlich.

AA wird sowohl durch Cyclooxygenasen (COX), als auch Lipoxygenasen (LOX) zu biologisch aktiven Metaboliten oxidiert, den Eicosanoiden, Abbildung 2. Traditionell gesehen bezieht sich der Begriff Eicosanoide auf die n-6 PUFA AA und die von ihr abgeleiteten Metabolite mit einer Kettenlänge von 20 C-Atomen, aber im weiteren Sinne wird er auch für n-3 PUFA-abgeleitete Metabolite verwendet. Die Signalwege der Eicosanoide sind wichtige klinische Ziele zur Behandlung von Entzündungen, Asthma, Fieber, Schmerz und kardiovaskulären Erkrankungen [72, 73].



**Abbildung 2: Die drei Wege der Arachidonsäure-Kaskade.**

Auch n-3 PUFAs (EPA und DHA) können durch COX-, LOX- und CYP-Enzyme zur biologisch aktiven Eicosanoiden metabolisiert werden.

### 1.2.2 Physiologische Bedeutung n-3 abgeleiteter Eicosanoide

AA, EPA und DHA sind konkurrierende Substrate für die COX- und LOX- vermittelte Eicosanoid-Biosynthese. Höhere Konzentrationen an EPA und DHA unterdrücken sogar die Synthese der AA-abgeleiteten Metabolite [8, 53, 62, 70]. Zudem haben n-3 PUFA abgeleitete Eicosanoide oft, aber nicht immer entgegengesetzte Eigenschaften zu den AA-abgeleiteten Metaboliten [53]. EPA z.B. hat die Kapazität die Biosynthese des pro-inflammatorischen Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) zu unterdrücken und wird selbst zu dem weniger starken LTB<sub>5</sub> umgewandelt [74]. Dyerberg und Bang gingen bei der kardioprotektiven Wirkung der n-3 PUFAs von einem anti-aggregatorischen Effekt aus. Der kompetitive Umsatz von EPA und AA mag zu einem Austausch des pro-aggregatorisch wirkenden Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) gegen das von der EPA-abgeleitete inaktive TXA<sub>3</sub> geführt haben [39]. Im Gegensatz dazu haben die Prostacycline von AA (PGI<sub>2</sub>) und EPA (PGI<sub>3</sub>) beide anti-aggregatorische Eigenschaften. Spätere Analysen zeigten, dass EPA als alternatives Substrat alle Schritte der AA-Prostanoidbiosynthese durchlaufen kann [70]. Dennoch, EPA und DHA stellen im Gegensatz zu AA schlechte Substrate für COX- und LOX-Enzyme in der Eicosanoid-Biosynthese dar [4].

Jüngste Untersuchungen belegen, dass EPA und DHA nicht nur mit AA um die Synthese klassischer COX- und LOX-abhängiger Eicosanoide konkurrieren. EPA und DHA sind auch Vorläufer einer neuen Klasse von anti-inflammatorischen und entzündungsauflösenden Lipidmediatoren: den Resolvinen, Protectinen und Maresinen [49, 75]. Sie entstehen durch transzelluläre Prozesse unter Beteiligung von LOX-Enzymen. Untersuchungen mit verschiedenen Tiermodellen für entzündliche Krankheiten bestätigen die wichtige Rolle dieser neuen Lipidmediatoren in der Auflösung/Linderung von Entzündungen (siehe Tab. 2 in Referenz [49]). Die Entdeckung von Resolvinen, Protectinen und Maresinen hat maßgeblich zum Verständnis des anti-inflammatorischen Effekts von n-3 PUFAs beigetragen.

Als Haupteffekt der herzschtützenden Funktion von n-3 PUFAs wird jedoch das Verhindern von Arrhythmien und dem Auftreten eines plötzlichen Herztods angesehen. Der molekulare Mechanismus der EPA- und DHA-vermittelten anti-arrhythmischen Effekte ist noch weitestgehend unbekannt.

Zur Identifizierung anti- oder pro-arrhythmischer Eicosanoide wurden verschiedene AA- und EPA-abgeleitete Eicosanoide im von Kang und Leaf etablierten Zellmodell getestet [76]. Die Untersuchungen ergaben ein pro-arrhythmisches Potenzial der AA-abgeleiteten Metabolite (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>). Die entsprechenden von EPA-abgeleiteten Metabolite PGD<sub>3</sub>, PGE<sub>3</sub> und PGF<sub>3α</sub> zeigten wesentlich schwächere oder

keine Effekte. Ferner wurden sowohl mit  $\text{PGI}_2$  als auch mit  $\text{PGI}_3$  anti-arrhythmische Effekte beobachtet [66]. Leukotriene hingegen blieben ohne Einfluss auf die Kontraktilität der NRKMs. Verschiedene Tierstudien und *in vitro* Versuche deuteten auf einen direkten Einfluss der n-3 PUFAs auf elektrophysiologische Signalwege in Kardiomyozyten hin [24, 28, 52, 77]. n-3 PUFAs veränderten das Ruhemembranpotential in eine verstärkt negative Richtung, sodass der Depolarisierungsstrom zur Auslösung eines Aktionspotentials erhöht sowie die Refraktärzeit verlängert wurde [50, 78]. Weiterführende wissenschaftliche Arbeiten zeigten, dass n-3 PUFAs modulatorisch auf die Aktivität von kardialen Ionenkanälen, wie den spannungsabhängigen, schnellen  $\text{Na}^+$ -Kanal, dem L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (LTCC),  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher oder auf kardiale  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle in der sarkolemmalen Membran wirken [50, 79-84]. Neuste Erkenntnisse schließen auch einen Einfluss der n-3 PUFAs auf die autonome Kontrolle des Herzens, insbesondere eine Erhöhung des Vagotonus, mit ein [27, 38].

### 1.3 Bildung und Wirkung von CYP-Eicosanoiden

Cytochrom P450-Enzyme (CYPs) sind intrazelluläre Häm-Thiolat-Proteine (Monooxygenasen), die molekularen Sauerstoff aktivieren, um fremde oder endogene lipophile Substanzen zu metabolisieren [85]. CYPs spielen im Menschen eine wichtige Rolle bei einer Reihe von katalysierten Reaktionen wie (i) Arzneimittelmetabolismus, (ii) Steroidhormonbiosynthese, (iii) stereo- und regiospezifischen Metabolismus von fettlöslichen Vitaminen und (iv) Oxidation von PUFAs zu biologisch aktiven Metaboliten [86]. Die Familie der CYP-codierenden Gene ist so groß, dass sie die größte Gen-Superfamilie bilden. CYP-Enzyme werden in einer Vielzahl von prokaryotischen als auch eukaryotischen Organismen exprimiert, wobei im menschlichen Genom 57 funktionelle CYP-Gene identifiziert wurden [87]. CYP-Enzyme sind integrale Membranproteine, die mittels einer hydrophoben am N-Terminus befindlichen Sequenz im endoplasmatischen Retikulum verankert sind [88]. Weiterhin bestehen CYP-Enzyme aus einer großen zytosolischen Domäne, welche eine prosthetische Gruppe mit Häm-Eisen umschließen. Im geringen Maße kommen CYP-Enzyme auch in Mitochondrien vor [85]. CYP-Enzyme werden v.a. in der Leber exprimiert, können aber auch in bedeutenden Mengen in extrahepatischen Geweben wie Lunge, Niere, Gastrointestinaltrakt und im Herzen auftreten. Die Expression und Aktivität der verschiedenen CYP-Enzyme stehen unter der Kontrolle von Hormonen sowie Wachstums- und Transkriptionsfaktoren [85].

Die Nomenklatur der CYPs erfolgt anhand ihrer Sequenzhomologien [89]. So gehören CYPs, die eine Sequenzhomologie von > 40 % aufweisen zu einer Familie (z.B. CYP2, CYP4), Tabelle 2. Die Einteilung der CYP-Enzyme in Unterfamilien erfolgt bei einer Übereinstimmung von > 55 % (z.B. CYP2C, CYP2J, CYP4A, CYP4F). Individuelle Mitglieder der Unterfamilien (Isoformen) werden zusätzlich mit einer Nummer gekennzeichnet (z.B. CYP2J2, CYP2C8, CYP2C9, CYP4A11, CYP4F2).

**Tabelle 2: AA-metabolisierende CYP Isoformen, die auch EPA und DHA als alternative Substrate akzeptieren.**

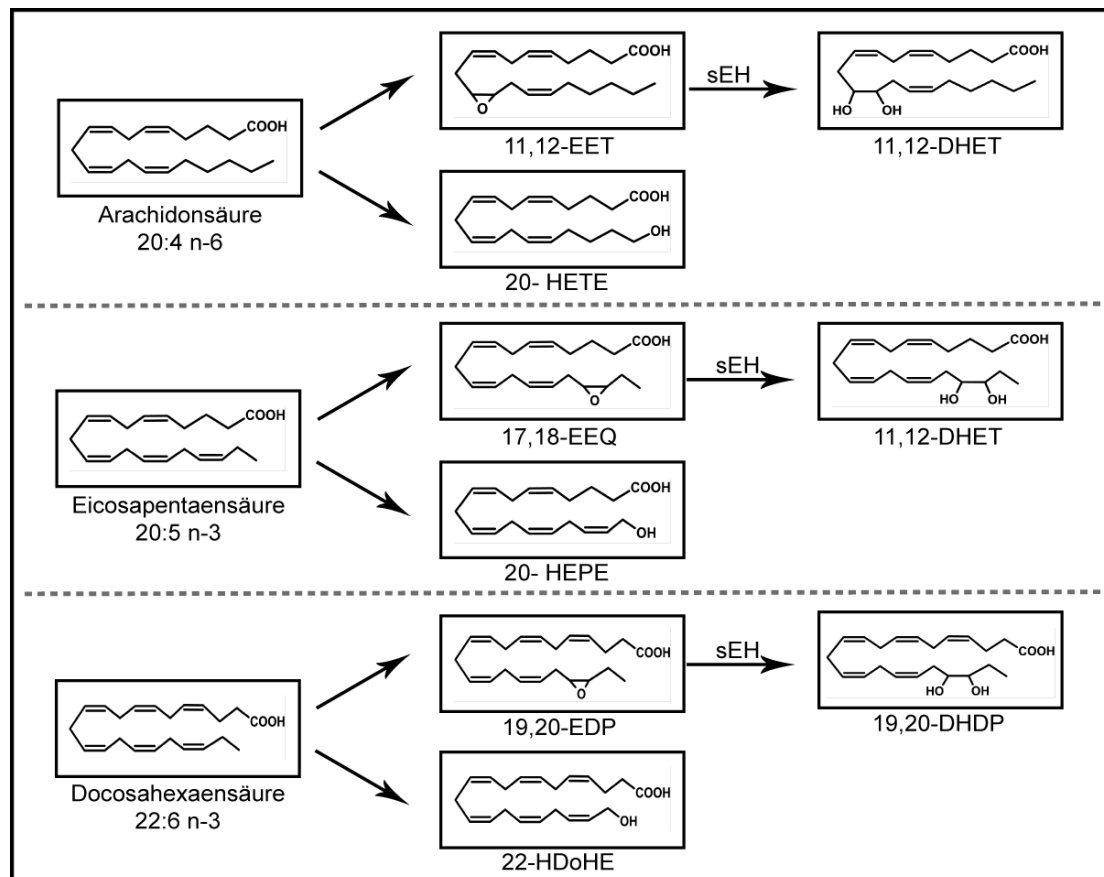
Tabelle abgeleitet aus [56].

Enzyme	AA	Hauptmetabolite		Ref.
		EPA	DHA	
CYP1A1	19-HETE	17,18-EEQ	19,20-EDP	[90-92]
CYP1A2	19-HETE	17,18-EEQ	19,20-EDP	[91]
CYP2C8	11,12-,14,15-EET	17,18-EEQ	19,20-EDP	[90, 91, 93, 94]
CYP2C9	14,15-, 11,12-EET	14,15-EEQ	10,11-EDP	[90, 91, 94]
CYP2C11	11,12-, 14,15-EET	14,15-, 17,18-EEQ	7,8-, 19,20-EDP	[93, 94]
CYP2C18	8,9-, 11,12-, 14,15-EET	11,12-, 17,18-EEQ	19,20-EDP	[90]
CYP2C19	8,9-, 14,15-EET	17,18-EEQ	7,8-, 10,11-, 19,20-EDP	[90, 91, 93]
CYP2C23	11,12-EET	17,18-EEQ	7,8-EDP	[93, 94]
CYP2E1	19-HETE	17,18-EEQ	19,20-EDP	[90, 91, 93]
CYP2J2	14,15-EET	17,18-EEQ	19,20-EDP	[90, 91, 93]
CYP4A1	20-HETE	19-, 20-HEPE, 17,18-EEQ	?	[95]
CYP4A11	20-HETE	19-, 20-HEPE	21,22-HDHA	[93, 96]
Cyp4a12a	20-HETE	20-HEPE, 17,18-EEQ	19,20-EDP	[93, 97]
CYP4F2	20-HETE	19-, 20-HEPE	22-HDHA	[96]
CYP4F3A	20-HETE	19-, 20-HEPE	22-HDHA	[96]
CYP4F3B	20-HETE	19-, 20-HEPE	22-HDHA	[96, 98]
CYP4F8	18-, 19-HETE	17,18-EEQ	19,20-EDP	[99]
CYP4F12	18-, 19-HETE	17,18-EEQ	19,20-EDP	[99]

Legende: HETE = Hydroxyeicosatetraensäure, EET = Epoxyeicosatriensäure, EEQ = Epoxyeicosatetraensäure, EDP = Epoxydocosapentaensäure, HEPE = Hydroxyeicosapentaensäure und HDHA = Hydroxydocosahexaensäure

CYP-Enzyme sind Schlüsselenzyme des sogenannten dritten Arms der AA-Kaskade [100-104]. Denn neben COX- und LOX- Enzymen kann AA auch von CYP-Enzymen umgesetzt werden. Erst 1981 wurde dieser alternative Weg der AA-Kaskade entdeckt [105-108]. Studien zur kardiovaskulären Bedeutung dieses Signalweges waren v.a.

auf AA als Vorläufer für biologisch aktive CYP-Metabolite fokussiert. Jedoch können auch die n-3 PUFA EPA und DHA als alternative Substrate für die meisten CYP-Enzyme dienen, die in der Lage sind AA umzusetzen [109]. CYP-Enzyme katalysieren abhängig von der Isoform den Umsatz von sowohl n-6 PUFA als auch n-3 PUFA zu biologisch aktiven Epoxy- oder Hydroxymetaboliten, Abbildung 3.



**Abbildung 3: Cytochrom P450 (CYP)-abhängiger n-6 bzw. n-3 PUFA Metabolismus.**

Die dargestellten Strukturformeln sind Beispiele verschiedener Epoxy- und Hydroxymetabolite, die durch einen regio- und stereospezifischen Umsatz verschiedener CYP-Isoformen entstehen können. Die Epoxymetabolite werden durch die sEH zu entsprechenden Diolen hydrolysiert. Die Abbildung wurde aus [6] angepasst.

Die Isoformen CYP4A und CYP4F, die eine  $\omega/(\omega-1)$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen, katalysieren den Umsatz zu entsprechenden Hydroxymetaboliten von AA (20-Hydroxyeicosatriensäure; 20-HETE), EPA (20-Hydroxyeicosapentaensäure; 20-HEPE) und DHA (22-Hydroxydocosahexaensäure; 22-HDoHE) [110], Abbildung 3. Unter den menschlichen Hydroxylasen setzt CYP4A11 EPA am effektivsten um. CYP4F2 hingegen katalysiert bevorzugt den Umsatz von DHA [56].

Mitglieder der CYP2J- und CYP2C-Subfamilien fungieren als Epoxygenasen. Abhängig von der Isoform setzen CYP-Enzyme die PUFA AA, EPA und DHA zu einer Reihe von regio- und stereoisomeren Epoxymetaboliten um, den

Epoxyeicosatriensäuren (EETs von AA), Epoxyeicosatetraensäuren (EEQs von EPA) und Epoxydocosahexaensäuren (EDPs von DHA) [104], Abbildung 3. Jedes Regioisomer kann als R,S- sowie als S,R-Enantiomer vorliegen [104]. CYP2J2, die im menschlichen Herzen am stärksten exprimierte Epoxygenase, generiert zwar alle von AA-abgeleiteten regioisomeren Epoxymetabolite, wobei v.a. 14(R),15(S)-EET dominiert [111]. 8,9- und 11,12-EET hingegen entstehen jeweils als racemisches Gemisch. Beim Umsatz von AA zeigt CYP2J2 nur eine geringe Regioselektivität, aber beim Umsatz von EPA und DHA zeigt CYP2J2 vorrangig eine ( $\omega$ -3)-Epoxygenaseselektivität. Manche der AA ( $\omega$ -1)-Hydroxylasen oder sogar  $\omega$ -Hydroxylasen fungieren mit EPA oder DHA als Substrat als ( $\omega$ -3)-Epoxygenasen, Beispiele sind: CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 und Cyp4a12. Als ( $\omega$ -3)-Epoxygenase generieren die meisten CYP-Isoformen von Säugern stereoselektiv R,S-Enantiomere. So entstehen durch den Umsatz von EPA und DHA bevorzugt die Epoxymetabolite 17(R),18(S)-EEQ bzw. 19(R),20(S)-EDP [109]. CYP2J2 zeigt eine Substratspezifität für EPA, das mit einer 17-fach höheren relativen Aktivität des Enzyms zu seinen Metaboliten umgesetzt wird als AA. Der DHA-Umsatz geschieht mit einer nur 4-fach erhöhten Aktivität von CYP2J2 gegenüber dem AA-Umsatz [56]. Enzymatisch werden die Epoxymetabolite durch die lösliche Epoxidhydrolase (*soluble epoxide hydrolase*; sEH) zu den korrespondierenden Diolen umgesetzt [112] (Abbildung 3), die im Allgemeinen biologisch unwirksam sind [113]. Nicht nur CYP-Enzyme, sondern auch die sEH zeigt eine Regio- und Stereoselektivität in der Effizienz beim Abbau verschiedener Epoxyeicosanoide [114, 115].

#### 1.4 Physiologische Bedeutung von CYP-Eicosanoiden im Herzen

CYP-Enzyme benötigen freie AA, NADPH und molekularen Sauerstoff, um die Monooxygenasereaktion wie oben beschrieben zu katalysieren. Unter physiologischen Bedingungen ist der Großteil von AA an der sn2-Position in Phospholipiden verestert. Daher hängt eine *de novo* Synthese von CYP-Eicosanoiden von extrazellulären Signalen ab, die PLA<sub>2</sub> aktivieren, um AA aus den Membranspeichern freizusetzen [72, 116, 117]. Im Gegensatz zu den kurzlebigen Prostanoiden und Leukotrienen, können CYP-Eicosanoide wieder zurück in Phospholipide verestert werden und stellen somit einen Membranvorrat an präformierten Hydroxy- und Epoxymetaboliten bereit, die durch die PLA<sub>2</sub> freigesetzt werden können [118, 119]. Diese Eigenschaften verbinden die Biosynthese, den Einbau und die Freisetzung von CYP-Eicosanoiden mit verschiedenen Signalwegen, die durch Hormone, Wachstumsfaktoren, mechanischen Stress, Hypoxie und



anderen Bedingungen ausgelöst werden und alle eine Aktivierung der PLA<sub>2</sub> gemein haben.

Unter pathologischen Bedingungen wie Entzündung oder Ischämie/Reperfusion (I/R) werden verschiedene PLA<sub>2</sub> aktiviert, was zunächst zur Freisetzung von PUFAs aus der Plasmamembran und letztlich zu einer massiven Produktion von CYP-Eicosanoiden in den betroffenen Geweben führen kann [72, 120, 121]. EETs und 20-HETE wirken als sekundäre Botenstoffe von verschiedenen Hormonen und Wachstumsfaktoren und beeinflussen vaskuläre, renale und kardiale Funktionen. Sie greifen somit modulatorisch in Signalwege ein, die Ionenkanäle, Transkriptionsfaktoren und Kinasen aktivieren [56]. Eine Vielzahl von Studien belegen, dass EETs vasodilatatorische, anti-inflammatorische und anti-apoptotische Mechanismen vermitteln und das Herz vor Schäden nach Ischämie-Reperfusion schützen [122] sowie Schutz vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz bieten [123]. Im Gegensatz dazu verstärken HETEs, insbesondere 20-HETE, die Gefäßkonstriktion und Entzündungen und verschlechtern damit kardiale Verletzungen [124].

Die kardioprotektive Funktion von EETs wurde zuerst mit der Entdeckung, dass eine exogene Gabe von 11,12-EET die funktionelle Erholung isolierter Rattenherzen nach Ischämie verbesserte, gezeigt [125], Tabelle 3. Der gleiche Effekt konnte mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Expression von CYP2J2 in Mäusen erzielt werden [122]. Es konnte auch gezeigt werden, dass EETs im isolierten Herzen vor Unregelmäßigkeiten im Elektrokardiogramm nach Ischämie schützte [126]. Im Herzen vom Hund und von der Ratte wurde die Infarktgröße nach transienter Verengung der Koronararterie stark reduziert [127-129]. EET-vermittelte kardioprotektive Effekte wurden mit Hilfe eines selektiven EET-Antagonisten (14,15-EEZE) aufgehoben [127]. Interessanterweise verhinderte 14,15-EEZE auch die schützenden Effekte einer ischämischen Vorkonditionierung oder nachfolgenden konditionierenden Effekten in Herzen von Hunden, was auf eine bedeutende Rolle der CYP-Epoxyeicosanoide in endogenen protektiven Signalwegen hinweist [130]. Eine über die Verbesserung von I/R-Schäden hinausgehende Wirkung von EETs, war der Schutz vor Doxorubicin-induzierter Kardiotoxizität, wie in CYP2J2-exprimierenden Tieren gezeigt wurde [131], Tabelle 3. In zwei unterschiedlichen Maus-Modellen zur Herzhypertrophie konnte zudem gezeigt werden, dass eine Kardiomyozyten-spezifische Expression von CYP2J2 gegen das Auslösen von Arrhythmien schützte [132].

Inhibitoren der sEH werden seit kurzem als wichtiges Werkzeug entwickelt, um die EET-Konzentration im kardiovaskulärem System zu erhöhen [113]. Die

pharmakologische Inhibition von sEH war sehr effektiv im Schutz vor einer Drucklast-induzierten Herzhypertrophie in Mäusen [133] oder unterband die Angiotensin II-induzierte Herzhypertrophie in Ratten [134]. Zudem wurde gezeigt, dass das sEH-Gen ein Suszeptibilitätsfaktor für Herzversagen in Ratten ist und dass sEH-KO Mäuse vor einer maladaptiven Herzhypertrophie geschützt waren [123].

**Tabelle 3: Tiermodelle zur Verifizierung der kardioprotektiven Wirkung von EETs.**

Modell	Genetische oder pharmakologische Intervention	Wirkung	Ref.
MI → Isoliertes Herz	CYP2J2-TG / 11,12-/14,15-EET	verminderte Infarktgröße / Aktivierung von $K_{ATP}$ -Kanälen und ERK1/2	[122, 127-129]
I/R-Schaden → Isoliertes Herz	CYP2J2-TG 14,15-EET	Schutz vor elektrophysiologischen Veränderungen nach Ischämie	[126]
I/R-Schaden	endogenes CYP2J3	Verbesserte Herzfunktion / Verminderte Infarktgröße	[130]
Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität	CYP2J2-TG	Verminderte Kardiotoxizität	[131]
Herzhypertrophie: Drucklast-induziert/ $\beta$ -adrenerge Stimulation	CYP2J2-TG	Schutz vor elektrophysiologischen Veränderungen und Auslösen von Arrhythmien	[132]
Drucklast-induzierte Herzhypertrophie	sEH-Inhibitor	Rückbildung der Hypertrophie / Hemmung der NF $\kappa$ B-Aktivierung / Verhindern von Arrhythmien	[133]
Ang-II induzierte / Herzhypertrophie	sEH-Inhibitor	Verminderte linksventrikuläre Hypertrophie	[134]
Drucklast-induzierte Herzhypertrophie	sEH-KO	Schutz vor Herzversagen und kardialen Arrhythmien	[123]
I/R-Schaden	sEH-KO	Verbesserte Herzfunktion / Aktivierung PI3K-Signalweg und $K^+$ -Kanälen	[135]
I/R-Schaden	CYP $\omega$ -Hydroxylase Inhibitor / 20-HETE Antagonist	Verminderte Infarktgröße / synergistischer Effekt mit IPC	[124, 136]
Ischämischer / hämorrhagischer Schlaganfall	CYP $\omega$ -Hydroxylase Inhibitor	Antagonisiert zerebrale Vasospasmen Verminderte Infarktgröße bei ischämischen Schlaganfall	[137]

Legende: MI = Myokardinfarkt, TG = transgene Tiere, I/R = Ischämie/Reperfusion, Ang II = Angiotensin II, sEH = lösliche Epoxidhydrolase, KO = knockout, IPC = ischämische Vorkonditionierung

Durch Ischämie ausgelöst, werden sowohl EETs als auch 20-HETE freigesetzt [138]. 20-HETE spielt eine wichtige schädigende Rolle in Ischämie-induzierten Organschäden. Der positive Effekt ischämischer Vorkonditionierung wurde durch Inhibition der 20-HETE Synthese verstärkt [136], Tabelle 3. Die Inhibition der

20-HETE Synthese reduzierte auch MIs und zeigte positive Effekte bei einem hämorrhagischen oder ischämischen Schlaganfall [124, 137].

### 1.5 Zelluläre Mechanismen von CYP-Eicosanoiden

Die herzschtützende Funktion der EETs beruht womöglich auf dem Zusammenspiel der anti-inflammatorischen, anti-hypertrophen und anti-apoptotischen Wirkung dieser CYP-Eicosanoide. Die Fähigkeit die Aktivierung des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu inhibieren, wurde für EETs in Endothelzellen [139], Kardiomyozyten [133] und Fibroblasten [140] nachgewiesen. Die EET-vermittelte Inhibition der NF- $\kappa$ B Aktivierung ist wahrscheinlich der entscheidende Mechanismus im Verständnis der anti-hypertrophen Effekte einer sEH-Inhibition im Angiotensin II und Drucklast-induzierten Modell für Herzhypertrophie [133, 134], Tabelle 3. Sowohl endogene als auch exogene EETs sichern im Myokardium das Überleben der Zellen über die Aktivierung von mindestens zwei anti-apoptotischen Signalwegen: die Aktivierung von PI3K/Akt und/oder ERK1/2 [141]. Nachfolgende Schritte beinhalten die Aktivierung von mitochondrialen ATP-sensitiven Kalium ( $mK_{ATP}$ ) Kanälen und die Inhibition der Öffnung von mitochondrialen „*permeability transition pores*“ (mPTP) [129, 141, 142]. Über die Regulation von L-Typ Kalziumkanälen (LTCC),  $Ca^{2+}$ -,  $K_{ATP}$ -,  $Na^+$ -Kanälen und den Erhalt der *gap junction* Integrität modulieren EETs elektrophysiologische Eigenschaften des Herzens [143-147].

Es ist noch unklar, ob die von den EETs vermittelten kardioprotektiven Effekte auch von den CYP-abhängigen Epoxymetaboliten der EPA bzw. DHA ausgeübt werden [56]. Aber es gibt Hinweise darauf, dass die EPA- und DHA-abgeleiteten CYP-Eicosanoide sogar stärkere Effekte als die von AA abgeleiteten EETs ausüben. Die Kapazität der EETs,  $K_{ATP}$ -Kanäle in Kardiomyozyten zu aktivieren, wird von den entsprechenden EPA- und DHA-Metaboliten deutlich übertroffen [148]. Auch in Gefäßen übersteigen EEQs und EDPs partiell die vasodilatorische Funktion der EETs [95, 149-151]. In einem Modell der TNF- $\alpha$  induzierten Entzündung der Lunge wirkte 17,18-EEQ stark anti-inflammatorisch [152, 153].

### 1.6 Mögliche Rolle von Rezeptoren in der Vermittlung von CYP-Eicosanoideffekten

Eine wesentliche noch ungeklärte Frage betrifft die Identität der primären zellulären Zielstrukturen von CYP-Eicosanoiden im Herzen und anderen Geweben. Die meisten biologischen Effekte dieser Metabolite beruhen auf der gezielten Aktivierung bestimmter intrazellulärer Signalwege. Derzeit werden zwei mögliche Mechanismen zur Vermittlung der CYP-Eicosanoid Effekte diskutiert. Einerseits wird eine direkte

Wechselwirkung der CYP-Eicosanoide mit Ionenkanälen, Transkriptionsfaktoren oder anderen intrazellulären Zielen vermutet, die zu einer spezifischen zellulären Antwort führen. Andererseits könnten CYP-Eicosanoide Membranrezeptoren (GPCRs) binden und so intrazelluläre Signalkaskaden anstoßen [56, 154]. Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen in verschiedenen Laboren scheinen letztere Hypothese zu stützen. So zeigen experimentelle Daten den Nachweis eines 47 kDa großen Membranproteins, welches hohe Affinität zu 11,12- und 14,15-EET aufweist [155, 156]. Der vasodilatatorische Effekt von AA-abgeleiteten EETs ist womöglich über einen oder mehrere Gas-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt [155, 157]. Eine EET-vermittelte Aktivierung von Gas-Protein gekoppelten Rezeptoren könnte auch den Anstieg von cAMP in Kardiomyozyten erklären [145]. Dieser Mechanismus führt zur Aktivierung von kardialen LTCCs [145, 146] und spielt womöglich eine wichtige Rolle während der funktionellen Erholungsphase von Herzen nach Ischämie. Einige kardioprotektive Effekte der Epoxyeicosanoide ähneln eher Signalwegen, die durch Aktivierung von Gai-Protein gekoppelten Rezeptoren während ischämischer oder chemischer Vorkonditionierung ausgelöst werden [158, 159]. Womöglich handelt es sich in Kardiomyozyten um eine Klasse von GPCRs mit einer Kopplung an verschiedene G-Proteine, welche wiederum mit diversen CYP-Eicosanoiden interagieren und so eine spezifische Rolle in der Vermittlung kardioprotektiver Effekte spielen. Bis jetzt konnten jedoch noch keine GPCRs für CYP-Eicosanoide identifiziert werden.

Alle derzeit bekannten Eicosanoid-Rezeptoren gehören zur Klasse der Lipidrezeptoren innerhalb der Rhodopsinfamilie, Tabelle 4. Die Rhodopsinfamilie stellt mit ~680 Rezeptoren die größte Klasse der GPCRs dar. In einer Arbeit von Bjarnadóttir et al. wurden 495 Maus- und 400 humane funktionale nicht-olfaktorische GPCRs miteinander verglichen [160]. Die Studie zeigte, dass die orthologen Paare für Lipidrezeptoren am geringsten konserviert waren. Lipidrezeptoren sind in mindestens drei verschiedenen phylogenetischen Gruppen innerhalb der Rhodopsinfamilie ( $\alpha$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ) anzutreffen. Im Allgemeinen lassen die Lipidliganden keine Rückschlüsse auf gleiche evolutionär bedingte Strukturmerkmale ihrer Rezeptoren zu. Daher sind neue GPCRs für z.B. CYP-Eicosanoide nicht einfach von schon bekannten Lipidrezeptoren ableitbar.

In der Gruppe der nicht-olfaktorischen rhodopsinähnlichen Rezeptoren wurden mittels phylogentischer Untersuchungen etwa 67 Rezeptoren identifiziert, deren Funktion und Ligand(en) bis jetzt noch unbekannt sind, sogenannten *orphan* GPCRs. Anstrengungen zur Ligandenidentifizierung für *orphan* GPCRs dieser Gruppe führten u.a. zur Entdeckung der *free fatty acid receptors* (FFAR1 = GPR40, FFAR3 = GPR41,

FFAR2 = GPR43 und FFAR4 = GPR120), die freie FS binden [161], Tabelle 4. Unter ihnen befindet sich GPR120, der in Adipocyten und Macrophagen exprimiert wird. GPR120 ist der einzige Rezeptor unter den FFARs, der langkettige PUFAs binden kann. Eine n-3 PUFA-Bindung an GPR120 vermittelt zelltypspezifisch anti-inflammatorische und Insulin-sensibilisierende systemische Effekte [67]. Wie oben beschrieben, können n-3 PUFAs in neue anti-inflammatorische und entzündungsauflösende Mediatoren umgewandelt werden: den Resolvinen, Protectinen und Maresinen. Über die möglichen zellulären Zielstrukturen dieser Metabolitenklasse wird derzeit noch diskutiert. Bisher hat man mehrere mögliche GPCRs (Chemokinrezeptor ChemR23, BTL<sub>1</sub>, ALX/FPR2 und GPR32, siehe Tabelle 4) als Zielstrukturen identifiziert [162]. Als molekulare Ziele von Resolvin E1 (RvE1), ein von EPA abgeleiteter Metabolit, wurden Chem23 und BTL<sub>1</sub> identifiziert. Beide Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle in der Vermittlung verschiedener anti-inflammatorischer Effekte von RvE1 [162]. Das aus DHA-abgeleitete Resolvin D1 (RvD1) zeigte eine spezifische Bindung an polymorphkernige Leukozyten im nanomolaren Bereich und aktivierte phagozytotische Prozesse [163]. Neben ALX wurde der *orphan* Rezeptor GPR32 als Vermittler der entzündungsauflösenden Wirkung von RvD1 identifiziert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die n-3 PUFAs und deren abgeleitete Metabolite eher über die Aktivierung einer Reihe von verschiedenen GPCRs ihre anti-inflammatorischen Effekte vermitteln, als nur ein einziges zelluläres Ziel zu haben. Ähnlich könnte es sich für die Vermittlung der Effekte von n-3 PUFAs abgeleiteten CYP-Eicosanoiden verhalten. Denkbar wäre eine noch nicht identifizierte neue Klasse von Rezeptoren, die regio- und stereospezifisch CYP-Eicosanoide binden und deren Aktivierung Teil der pleiotropen kardioprotektiven Wirkung von n-3 PUFAs ist.

**Tabelle 4: Bekannte Eicosanoid-Rezeptoren und kürzlich neu entdeckte GPCRs.**

<b>Eicosanoid-Rezeptoren</b>				
<b>Klasse</b>	<b>Rezeptor</b>	<b>Ligand</b>	<b>G-Protein</b>	<b>Referenz</b>
Leukotriene	CysLT <sub>1</sub>	Cysteinyl-Leukotrien C <sub>4</sub> (LTC <sub>4</sub> )	Gq	[164]
	CysLT <sub>2</sub>	Cysteinyl-Leukotrien D <sub>4</sub> (LTD <sub>4</sub> )	Gq	[164]
	CyLT <sub>E</sub>	Cysteinyl-Leukotrien E <sub>4</sub> (LTE <sub>4</sub> )	Gi	[164]
	BLT <sub>1</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub> (LTB <sub>4</sub> ); RvE1	Gi	[162, 165]
	BLT <sub>2</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub> (LTB <sub>4</sub> )	Gi	[165]
Prostanoide	DP <sub>1</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub> (PGD <sub>2</sub> )	Gs	[166]
	DP <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub> (PGD <sub>2</sub> )	Gi	[166]
	EP <sub>1</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )	Gq	[166, 167]
	EP <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )	Gs	[166, 167]
	EP <sub>3</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )	Gi	[166, 167]
	EP <sub>4</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )	Gs	[166, 167]
	FP	Prostaglandin F <sub>2α</sub> (PGF <sub>2α</sub> )	Gq	[166]
	IP	Prostacyclin (PGI <sub>2</sub> )	Gs	[168]
	TP	Thromboxan A <sub>2</sub> (TXA <sub>2</sub> )	Gq	[169]
Lipoxine	ALX	Lipoxin A <sub>4</sub> (LXA <sub>4</sub> ); RvD1	Gi	[162, 170]
Oxoeicosanoide	OXER <sub>1</sub>	5-OxoETE	Gi/o	[171, 172]
<b>Kürzlich entschlüsselte FS-Rezeptoren</b>				
<b>Rezeptor</b>	<b>Ligand</b>		<b>G-Protein</b>	<b>Referenz</b>
GPR31	12-(S)-HETE		?	[173]
GPR32	RvD1, LXA <sub>4</sub>		Gi	[162]
GPR40	Mittellange und lange freie Fettsäuren (FFS)		Gq/11	[54]
GPR41	kurzkettige FFS		Gi	[54, 174]
GPR43	kurzkettige FFS		Gq/11, Gi	[54, 174]
GPR84	FFS mit mittlerer Kettenlänge (C9-C14)		Gi	[175]
GPR120	mittellange und lange FFS (u.a. DHA)		Gq/11	[54, 67]

## 1.7 Zielsetzung

Die n-3 PUFAs EPA und DHA, die v.a. in fettem Fisch enthalten sind, schützen vor kardiovaskulären Erkrankungen und insbesondere Arrhythmien (vgl. Kapitel 1.1). Rekombinante CYP-Enzyme können EPA und DHA zu biologisch aktiven Metaboliten umsetzen (vgl. Kapitel 1.3).

Daraus abgeleitet war das **erste Ziel dieser Arbeit zu zeigen, ob über die Nahrung aufgenommene n-3 PUFAs (EPA+DHA) das endogene CYP-Eicosanoidprofil im Menschen modulieren.** Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine klinische Studie mit 20 gesunden Teilnehmern durchgeführt.

Weiterführende Untersuchungen befassten sich mit der anti-arrhythmischen Wirkung von n-3 PUFAs. Mit Hilfe eines etablierten Zellmodells in neonatalen Rattenkardiomyozyten sollten sowohl die Vorläuferfettsäure EPA als auch der daraus abgeleitete CYP-Epoxymetabolit 17,18-EEQ vergleichend betrachtet werden. **Zweites Ziel der Arbeit war es zu zeigen, dass n-3 PUFAs abgeleitete CYP-Epoxyeicosanoide die eigentlichen Vermittler der kardioprotektiven Wirkung von n-3 PUFAs sind.** Anschließende Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung sollten Aufschluss darüber geben, welche strukturellen Merkmale von 17,18-EEQ für den negativ chronotropen Effekt in NRKMs verantwortlich sind. Dafür erhielten wir von unserem Kooperationspartner J.R. Falck (UT Southwestern, Dallas, Texas, USA) gezielt modifizierte Strukturanaloga.

Studien verschiedener Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass CYP-Eicosanoide, die von AA abgeleitet sind, über GPCRs intrazelluläre Signalkaskaden anstoßen. Die Befunde der Strukturfunktionsanalyse von 17,18-EEQ sprechen ebenfalls für einen GPCR-vermittelten Mechanismus. Zur Untersuchung eines G-Protein vermittelten Mechanismus, sollte der Einfluss von Pertussistoxin (Inhibitor von G $\alpha$ i-Proteinen) auf den 17,18-EEQ Effekt in NRKMs getestet. Da die Identität solcher Rezeptoren noch völlig unbekannt ist, war das **dritte Ziel dieser Arbeit einen möglichen Rezeptorkandidaten für n-3 PUFA abgeleitete CYP-Eicosanoide zu identifizieren.** Die Suche und Auswahl eines möglichen Rezeptorkandidaten sollte über Sequenzhomologien von schon bekannten Lipidrezeptoren und *orphan* GPCRs ermittelt werden. Weiterhin sollten Untersuchungen sowohl mit NRKMs als auch mit Zellen, die einen möglichen Rezeptorkandidaten heterolog exprimierten, stattfinden. Zur Verifizierung der Ligandenspezifität des Rezeptors sollten Bindungsversuche mit Insekten- bzw. Säugerzellen durchgeführt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien und Chemikalien

#### 2.1.1 Chemikalien

Die für diese Arbeit benötigten Chemikalien wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von folgenden Firmen erworben: Carl Roth GmbH, Fluka, Merck, Life Technologies (ehemals Invitrogen, Gibco), Sigma Aldrich, Millipore, Amersham Bioscience und Roche.

#### 2.1.2 PCR-Primer

Zielgen	Primer	Sequenz (5' ... 3')
GPR120	vorwärts	CGGCGCTGCTGGCTTTCATAT
	rückwärts	CCTGCCGGAAGTTCTGGATCAAG
GPR135	vorwärts	CGCCGCCTTCCTCGACCTGTT
	rückwärts	GGGCCCCAGCAGCAGATGACAA
GPR150	vorwärts	TGCGTGCAGGAGGAAGAAGC
	rückwärts	GGGCATTGTGAGAGGAACCA
GPR153	vorwärts	GCTCGCTCTGCCTCGGTCTC
	rückwärts	CCCTCCAGGCGACATCAGAA
GPR162	vorwärts	GCCAGCCTTCGACAGTTTCT
	rückwärts	CGGGTGAGTTGGGTATCTGG
GPR173	vorwärts	CGCCCACCACCGCTTCTATGC
	rückwärts	CGGCCCAGCTGCTTTTTCACCCT
GPR22	vorwärts	TGGAAATGCGTGGGAAAACA
	rückwärts	TCGTTCCCGGTGTCGTTTCA
GPR25	vorwärts	TCGGGCTGTTGCTGCTGCTACTG
	rückwärts	GCCGAGCTGATCCTGCGCACCT
GPR26	vorwärts	CCGCGCTCGCCCTGTCCT
	rückwärts	CGCAGCAAGGAGTACACGAAGGG
GPR27	vorwärts	CGCCGCGATGCTGGTGTG
	rückwärts	GCCCCAGAGGAGCAGGAAGAG
GPR85	vorwärts	GCTGACTGCTGGCGAAGGTT
	rückwärts	GGGAAGAGGGGAAAGCATTG
GPR88	vorwärts	GCCCCAAGCCCTTTATTCT
	rückwärts	TGCCACATGCCCGATAAGTT
hGPCR8	vorwärts	CGCGGGCTCGGTGGGGTTTAT
	rückwärts	CCGCGCCACCAGGAAGATGCTAC
GAPDH	vorwärts	CCCCTTCATTGACCTCAACTA
	rückwärts	ATGCATTGCTGACAATCTTGAG



### 2.1.3 TaqMan-Primer

Spezies	Zielgen	Primer	Sequenz (5' ... 3')
Ratte	GPR22	vorwärts	CCATAAAGCAACAGCGAACA
		rückwärts	TTCAGACTGCATGTTGATTTC
Mensch	GPR22	vorwärts	AGGCTTGTGTATCTTTTGCAAGTG
		rückwärts	TTGCAGGTTTTACAGAGATGTCATATC
		Sonde	6-FAM-ACAGCAATCAACGTTTTTGCTATC- ACTTTGGA-TAMRA
Mensch	GPRopt	vorwärts	CGGCCGCTGAGCTT
		rückwärts	GCTCTCGCTCTGCATGTTGA
		Sonde	6-FAM-TGTGCTTCAGCCCCATCCTGGAA- TAMRA

### 2.1.4 Plasmide

Plasmid	Verwendung	Anbieter
pMA	Mit Codon-optimierter Sequenz; Zum Einbringen der Melittin-Signalsequenz und des HisTag verwendet	GeneArt
pcDNA3.1 (-)	Heterologe Expression in Säugerzellen unter CMV-Promotor und für stabile Transfektion mittels G418-Selektion	Invitrogen
pOET2	Heterologe Expression in Insektenzellen unter ph-Promotor Transfervektor	Oxford

### 2.1.5 DNA- und Protein-Marker

Bezeichnung	Anbieter
1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
100 bp ladder	Invitrogen
AGOWA Mengenstandard (100 ng $\hat{=}$ 1,2 $\mu$ l)	LCG Genomics
G190A Blue Orange 6x Loading Dye	Promega
SeeBlue® Marker Plus2, Protein Standard	Invitrogen
Supercoiled DNA Ladder (SC Marker)	Invitrogen

### 2.1.6 Antikörper

#### 2.1.6.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Klonalität	Spezies	Wirtsspezies	Anbieter
anti-GPR22	polyklonal	Mensch	Kaninchen	Novus Biologicals
anti-GPR22	monoklonal	Mensch	Maus	R&D Systems Inc.
anti-GPR22	polyklonal	Mensch	Kaninchen	Atlas Antibodies
anti-GPR22	polyklonal	Mensch	Kaninchen	AG Schunck

### 2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Klonalität	Wirtsspezies	Anbieter
Anti-Polyhistidine	polyklonal	Kaninchen	Sigma Aldrich
Meerrettichperoxidase gekoppeltes IgG	polyklonal	Ziege	Sigma Aldrich

### 2.1.7 Fluorochrome

Fluorochrom	Anregung	Emission	Anbieter
Cy <sup>TM</sup> 3–conjugated AffiniPure Donkey anti-mouse/ anti-rabbit IgG	550 nm	570 nm	Jackson Research Immuno
DAPI	360 nm	460 nm	Vector Laboratories
Fluoreszein (FITC) konjugiertes Streptavidin	492 nm	520 nm	Jackson Research Immuno

### 2.1.8 Enzyme

Enzym	Anbieter
Proteinase K	
Restriktionsendonukleasen: HindIII, XhoI, BamHI, Bsu36I, PaeI	New England Biolabs Inc. (NEB)
RNase A	
SuperScript <sup>TM</sup> reverse Transkriptase	Invitrogen, Life technologies

### 2.1.9 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

<b>STET - Puffer</b>	8 % (w/v)	Saccharose
	1 % (v/v)	TritonX 100
	50 mM	EDTA
	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	Lagerung bei 4 °C	
<b>Cetyltrimethylammoniumbromid- (CTAB) Lösung</b>	5 % (w/v)	CTAB in H <sub>2</sub> O
	Lagerung bei 37 °C	
<b>TE - Puffer</b>	10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA
<b>Lysispuffer zur Gewinnung von gDNA</b>	100 mM	Tris/HCl pH 8,5
	5 mM	EDTA
	200 mM	NaCl
	0,2 %	SDS

<b>RNase A</b>	20 µg/ml	SL in TE
<b>Tris-Acetat-EDTA (TAE) – Puffer</b>	242 g	Tris base
<b>50x Stammlösung</b>	57,10 g	Eisessig
	100 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	auf 1 L mit A.dest auffüllen	
	1x TAE Puffer vor Gebrauch herstellen	
<b>GelRed-Färbelösung</b>	5 ml	1M NaCl
	45 ml	A. bidest.
	15 µl	GelRed

### 2.1.10 Puffer und Lösungen für mikro- und zellbiologische Arbeiten

<b>Luria-Bertani (LB) - Medium</b>	1,0 %	Bacto Trypton
	0,5 %	Hefeextrakt
	1,0 %	NaCl
	pH 7,0 mit 1N NaOH einstellen und autoklavieren	
<b>LB - Agar</b>	1,0 %	Bacto Trypton
	0,5 %	Hefeextrakt
	1,0 %	NaCl
	pH 7,0 mit 1N NaOH einstellen	
	2,0 %	Agar-Agar
	autoklavieren	
<b>Antibiotika</b>		Ampicillin
<b>S.O.C. Medium</b>	2 %	Bacto-Trypton
Super Optimal Broth with Catabolite	0,5 %	Hefeextrakt
Repression	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	Lösung sterilisieren	
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	20 mM	Glukose

## 2.1.11 Puffer und Lösungen für Proteinbiochemie

### 2.1.11.1 Puffer für die Gewinnung von Proteinproben

<b>Lowry Lösung 1</b>	0,98 ml	0,1 N NaOH + 2 % NaCO <sub>3</sub>
	0,01 ml	2 % Kalium-Natrium-Tartrat
	0,01 ml	0,5 % CuSO <sub>4</sub>
<b>Lowry Lösung 2</b>	0,01 ml	50 % Folin-Ciocalteaus-Phenolreagenz
		1:1 in A.bidest

### 2.1.11.2 Puffer für SDS-PAGE und Western blot

<b>Probenverdünnungspuffer</b>	20 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	2 mM	EDTA
	20 %	Glyzerin
	2 %	SDS (v/v)
	160 mM	DTT
	6 M	Harnstoff
	0,1 mg/ml	Bromphenolblau
<b>Gellaufpuffer nach Laemmli</b>	25 mM	Tris, pH 8,0
	192 mM	Glycin
	1 %	SDS
<b>Transferpuffer nach Laemmli</b>	0,25 M	Tris
	1,92 M	Glycin
	10 %	99,9 % EtOH
<b>1x PBS</b>	140 mM	NaCl
	10 mM	PO <sub>4</sub>
	3 mM	KCl
	1 Tablette in 500 ml A. bidest gelöst	
<b>Waschpuffer</b>	1x	PBS
	0,1 %	Tween 20
<b>Blocklösung in Waschpuffer</b>	5 %	Magermilchpulver
<b>Ponceau-Rot</b>	0,5 %	Ponceau S
	1,0 %	Essigsäure

<b>Superlumi</b>	150 µl	Lumigen™ Lösung A
	150 µl	Lumigen™ Lösung A
	A+B auf 10 ml A. bidest	

### 2.1.12 Puffer und Lösungen für Membranfärbung

<b>Natriumacetat - Puffer</b>	100 mM	Natriumacetat
	pH 5,5 mit 1N NaOH	
	in A. bidest	
<b>Natriumperiodat - Lösung</b>	10 mM	Natriumperiodat
	in 1x PBS	
	immer frisch ansetzen	
<b>EZ-Link® Biotin-Hydrazid</b>	1 mM	Biotin-Hydrazid
	in Natriumacetat- Puffer	
	immer frisch ansetzen	
<b>Ammoniumchlorid - Puffer</b>	267 g	Ammoniumchlorid
	in 100 ml 1x PBS	4°C Lagerung

### 2.1.13 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz

<b>Paraformaldehyd</b>	4 % (w/v)	Paraformaldehyd
	bei 60 °C in 1x PBS für 2 h lösen	
	sterilfiltrieren, frisch ansetzen	
<b>Blocklösung</b>	5 % (w/v)	BSA
	in 1x PBS	
<b>Inkubationslösung</b>	1 % (w/v)	BSA
	in 1x PBS	

### 2.1.14 Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Spezies</b>	<b>Anbieter</b>
<b>HEK293</b> (human embryonal kidney cells)	Mensch	Life Technologies
<b>NRKM</b> (neonatale Rattenkardiomyozyten)	Ratte	Primärzellen: präpariert von Frau Hempel (E.R.D.E. e.V.) oder Herrn Wallukat
<b>Sf9- Insektenzellen</b> (Ovarzellen von <i>Spodoptera frugiperda</i> )	Insekten	Life Technologies

### 2.1.15 Kits

Kit	Anbieter
DNA extraction kit	Invitex (Stratek)
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
innuPREP Gel extraction kit	Analytik Jena
Peqlab Gold (PCR-Mastermix)	Peqlab
pOET expression Kit	Oxford Expression Technologies
RNase free DNase Set	Qiagen
RNeasy® Mini-Kit	Qiagen

### 2.1.16 Geräte

Wenn nicht gesondert im Protokoll erwähnt, dann wurden folgende Geräte verwendet:

Gerät	Hersteller
Analysewaage Typ41	Kern
BioDoc Gelanalysesystem	Biometra
Biofuge 15	Haereus
Blotting Apparatur (semi-dry)	BioRad
CO2-Brutschrank	Biometra
Elektrophoreseapparatur (PowerPac300)	BioRad
Gene Pulser™	BioRad
Konfokalmikroskop LSM700	Carl Zeiss
Lichtmikroskop CK2 ULWCD 0.30	Olympus
Mikro 120 Zentrifuge	Hettich
Multifuge 15-R Zentrifuge	Thermo Scientific
PCR-Gerät (qRT-PCR)	Applied Biosciences
PCR-Gerät (RT-PCR)	Techne
Schüttler (CERTOMAT® HK)	B. Braun
Spektrophotometer (UV-2401 PC)	Shimadzu
Thermoblock: Thermostat TCR 100	Carl Roth
Thermoschüttler 5436	Eppendorf
Vortexer	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik
Waage SI-2002	Denver Instruments

### 2.1.17 Software

Software	Anbieter
----------	----------

Ape (Universal)	<a href="http://bioweb.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/">http://bioweb.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/</a>
ChemSketch	Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs)
ClustalW2	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>
EndNote X5	Thomson Reuters
GraphPad Prism 5.0d	GraphPad Software Inc.
Illustrator CS4	Adobe
MS Office 2011	Microsoft
Primer Express 3.0	Applied Biosystems
Sequence manipulation suite (SMS)	<a href="http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html">http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html</a>
PAWS Statistics 18	SPSS Inc.

## 2.2 Methoden zur klinischen Studie

OMEICOS-Studie (CCB-KARD-09-01) / EudraCT-Nr.: 2009-013258-33

*Studienort:* ECRC, Berlin-Buch

*Studienleiter:* Dr. med. R. Fischer

*Prüfärzte:* Dr. med. R. Fischer, Dr. med. H. Mehling, P. Kast, C. Schröder

### 2.2.1 Studiendesign

In einer monozentrischen klinischen Studie mit 10 weiblichen und 10 männlichen gesunden Teilnehmern im Alter zwischen 23 und 47 Jahren wurde durch Gabe von Omacor®-Kapseln (480 mg EPA + 360 mg DHA) der Einfluss der Ernährung auf das endogene CYP-Eicosanoidprofil untersucht. Es wurde eine offene Studie ohne Kontrollgruppe gewählt, da der primäre Zielparameter relativ unempfindlich gegenüber Störvariablen ist. Zielparameter war eine Veränderung des n-3/n-6 Verhältnisses von CYP-Eicosanoiden in Erythrozyten nach Gabe von Omacor®.

Die Probanden bekamen für vier Wochen 1 g Omacor® pro Tag und vier weitere Wochen 2 g Omacor® pro Tag. Anschließend wurde das Medikament abgesetzt und die Probanden für weitere acht Wochen beobachtet. Eine Woche vor Studienbeginn sowie in den Wochen 1, 4, 8, 9 und in Woche 16 nach Behandlungsbeginn wurden Blutproben (morgens, im nüchternem Zustand) und Urinproben (24 h Sammelurin) gewonnen und wie im folgenden Abschnitt beschrieben analysiert.

### 2.2.2 Aufarbeitung und Messung der Proben

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie in Arnold et al. [109] beschrieben. 500 µl Plasmaprobe wurde mit internem Standard versetzt und eine alkalische Hydrolyse durchgeführt. Die alkalische Hydrolyse diente dem Herauslösen veresterter Fettsäuren (u.a. CYP-Metabolite) aus Glycerophospholipiden und Lipoproteinen. Zur Aufkonzentration und Aufreinigung der Metabolite aus den Proben wurde eine Festphasenextraktion durchgeführt. Die von der Säule eluierten Metabolite wurden unter Stickstoffbegasung verdampft und in Acetonitril aufgenommen. Die Proben standen so einer Analyse mittels LC-MS/MS zur Verfügung. Die Urinproben (2 ml) wurden mit 0,2 mg β-Glucuronidase von *E. coli* in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,8), der 1 mg/ml Rinderserumalbumin enthielt, für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der pH mit Essigsäure auf 6,0 eingestellt und die Metabolite mittels Festphasenextraktion wie oben beschrieben extrahiert.

Zur Untersuchung des Supplementations-Effektes auf die Bildung von Leukotrienen und Prostanoiden wurde deren *de novo* Synthese mit einem Ca<sup>2+</sup>-Ionophor (A23187,



Sigma Aldrich) in heparinisierten Vollblutproben stimuliert. Dazu wurden 7,5 ml Vollblut der Probanden mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor für 30 min bei 37 °C im Wasserbadschüttler inkubiert. Danach wurden die Proben 10 min bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert, um Plasma für die weitere Aufarbeitung (siehe oben) zu gewinnen.

Die oben beschriebene Aufarbeitung der Plasmaproben erfolgte durch Christel Andrée (AG Schunck) und die Aufarbeitung der Urinproben durch Inci Dogan (Lipidomix GmbH). Die Messung des Metabolitenprofils mittels LC-MS/MS wurde von der Firma Lipidomix GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführt.

Die Zusammensetzung der Fettsäuren wurde nach der Methode zur Bestimmung des HS-Omega-3 Index<sup>®</sup> aus Erythrozytenproben von der Firma Omegamatrix GmbH (Martinsried, Deutschland) bestimmt [176]. Dazu wurden Fettsäure-Methylester mittels säurekatalysierter Umesterung (direkte saure Hydrolyse mit anschließender Transmethylierung) hergestellt und dann gaschromatographisch gemessen. Unter folgenden Link finden Sie eine genaue Beschreibung dieser Methode: <http://www.patent-de.com/20090924/DE102009021678A1.html>

### **2.2.3 Definition von Omega-3 Index und CYP-Eicosanoid-Index**

Der sogenannte Omega-3 Index berechnet sich aus der Summe von EPA und DHA als prozentualer Anteil an den Gesamtfettsäuren in Erythrozyten. Der Gehalt an omega-3 PUFAs in Erythrozytenmembranen korreliert mit dem Anteil in anderen Geweben und Organen, u.a. im Herzen. Der Omega-3 Index in Erythrozyten kann also als Maß für den n-3 Fettsäurestatus in Herzgewebe dienen [43] und gibt bei der durchgeführten klinischen Studie Auskunft über den omega-3 Fettsäurestatus der Probanden zu allen Untersuchungszeitpunkten der Studie.

Der CYP-Eicosanoid-Index hingegen definiert sich als Ratio aus der Summe von (EEQs+Diöle) und (EDPs+Diöle) über (EETs+DHETs) und gibt Auskunft über den Status an CYP-abhängigen Metaboliten, die aus EPA und DHA hervorgegangen sind. Da in Erythrozyten auch CYP-unabhängig Epoxymetabolite entstehen können, wurde der CYP-Eicosanoid-Index nur aus den Plasma- und Urinproben der Probanden bestimmt.

### **2.2.4 Messung klinischer Risikofaktoren**

Routinemäßig wurden zu allen Zeitpunkten auch klinische Parameter wie das Körpergewicht, der Blutdruck, Plasmatriglyzeride und ein Elektrokardiogramm sowie Nahrungsgewohnheiten dokumentiert.

## 2.3 Molekularbiologische und gentechnische Methoden

### 2.3.1 RNA-Isolation

Zur Gewinnung von RNA aus Geweben wurde ein Aliquot pulverisierten Gewebes mit dem Lysisreagenz QIAzol (Qiagen) und 2,8 mm großen Keramikkügelchen versetzt und mittels Precelly24 Homogenisator (Peqlab) homogenisiert. Nach einer Zentrifugation wurde die RNA-enhaltende wässrige Phase in Säulen aus dem RNeasy Kit (Qiagen) überführt. Bei Zellen erfolgte der Zellaufschluss durch einmalige Zentrifugation durch Shredder-Säulen (Qiagen) der Zellsuspension in RLT-Lysispuffer, der mit 10 µl/ml β-Mercaptoethanol versetzt war. Der Durchlauf wurde auf Spin-Säulen aufgetragen. Nach dem ersten Waschschrift wurde auf der Säule ein DNase-Verdau (RNase free DNase Set, Qiagen) durchgeführt. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Protokoll des Herstellers. Die Qualität und Quantität der präparierten RNA wurden mittels Spektrophotometer (Nanodrop) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die dauerhafte Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -80 °C.

### 2.3.2 cDNA-Synthese

Für RT-PCR: Die reverse Transkription wurde mit oligo-dT<sub>20</sub> Primern und SuperScript™ reverse Transkriptase (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. 1 µg aufgereinigte Gesamt-RNA (RNAeasy Kit, Qiagen) pro Probe diente als Vorlage für jede Reaktion.

Für qRT-PCR: Die reverse Transkription erfolgte nach Protokoll des Herstellers mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies), das Radom-Primer für die Transkription enthielt. Zur Umschreibung wurden 2 µg aufgereinigte Gesamt-RNA (RNAeasy Kit, Qiagen) verwendet.

### 2.3.3 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die für die PCR notwendigen Primer wurden mit Hilfe des im Internet frei zugänglichen Programms Primer-BLAST von NCBI entwickelt (siehe Liste der verwendeten Primer unter 2.1.2). Die RT-PCR wurde mit Chemikalien von Peqlab durchgeführt. Bei jeder PCR wurde eine Wasserkontrolle als Negativkontrolle mitgeführt. Die PCR bestand, wenn nicht anders angeführt, aus 38 Zyklen mit einer initialen Denaturierung von 10 min bei 95°C, dem Aufschmelzen (30 sec, 95 °C), der Anlagerung (30 sec, entsprechende Anlagerungstemperatur), der Elongation (45 sec, 72 °C) und einer finalen Verlängerung (72 °C für 5 min, 4 °C). Die Anlagerungstemperatur errechnete sich nach folgender Formel:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 69,3 + (0,41 \cdot \text{GC}) - (650/L) - 5$$

$T_m$  = Anlagerungstemperatur; GC = prozentualer Anteil von G und C in der Primersequenz und L = Länge des Primers.

#### 2.3.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Quantitative RT-PCR wurde unter Nutzung eines Man® Fast Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems) am 7500 Fast Real-time PCR System durchgeführt (Applied Biosystems). Zur Analyse von cDNA-Proben mittels qRT-PCR wurden Primer mit Sonden mit Hilfe des Programms Primer Express 3.0 entworfen (verwendete Primer siehe 2.1.3) und das Messprotokoll nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Probe wurden 0,2 ng cDNA verwendet. Die Proben wurden in biologischen Triplikaten und je nach Probenaufwand in technischen Duplikaten oder Triplikaten gemessen. Für die Normalisierung der Proben wurde die Expression des Referenzgens 18S in den gleichen Proben gemessen. Die Quantifizierung der Proben erfolgte nach der Methode der relativen Standardkurve.

#### 2.3.5 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und PCR-Fragmente wurde mit Endonukleasen von NEB nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA aus einer Probe wurde der Gehalt an Agarose und die Agarosesorte ausgewählt. Für eine Gelelektrophorese mit Plasmiden wurde ein 1 - 1,5 %tiges Gel mit NEEO-Agarose (Carl Roth) in 1x TAE-Puffer angesetzt. Zur Analyse von kleineren Fragmenten (< 1000 bp) wurden 2 %tige Gele mit High Resolution Agarose (Carl Roth) angefertigt. Die Gele liefen für 60 min bei 75 - 100 V in 1x TAE-Puffer. Für die Analyse der DNA im Gel wurde das Gel mit einem DNA-interkalierenden Farbstoff (GelRed, Biotum) für 15 min gefärbt und unter UV-Licht die DNA-Banden sichtbar gemacht. Es erfolgte eine Aufnahme des Gels mit dem BioDoc Gelanalysegerät von Biometra zur Dokumentation.

#### 2.3.7 DNA-Gelextraktion

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde zunächst ein Agarosegel mit der zu isolierenden DNA-Probe laufen gelassen. Das Gel wurde wie unter 2.3.6 beschrieben gefärbt und dann unter UV-Licht die entsprechende Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Gelstück erfolgte mit entsprechenden Kits von innuPREP Analytik Jena. Die Aufarbeitung der

Probe erfolgte nach jeweiliger Anleitung des Kit-Herstellers. Welches Kit verwendet wurde, wird im Folgenden genau gekennzeichnet.

### 2.3.8 Ligation

Für die Ligation wurde T4-Ligase (NEB) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der folgende Ligationsansatz (20 µl) wurde für 1 h bei RT inkubiert:

5 µl	ca. 300 ng geschnittener Vektor
2 µl	Oligonukleotide
2 µl	Ligationspuffer
1 µl	Polyethylenglykollösung
1 µl	T4 Ligase
9 µl	Wasser

### 2.3.9 Transformation von *E.coli* –Zellen mittels Elektroporation

Zur Transformation von Plasmiden in *E.coli*–Zellen wurde der elektrokompetente Stamm TOP10 verwendet. 40 µl dieser Zellen wurden in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und, wenn nicht anders vermerkt, mit 2 µl Plasmid/Ligationsansatz versetzt. Es folgte eine Inkubation von 1 min auf Eis. Die Elektroporation wurde bei 2,25 kV, 25 µF, 200 Ohm durchgeführt. Danach wurde der Ansatz in 1 ml S.O.C.-Medium überführt und eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. 20 µl, 50 µl (jeweils auf 100 µl mit S.O.C.-Medium aufgefüllt) und 100 µl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert, die 50 µg/ml Ampicillin enthielten. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht.

### 2.3.10 Plasmidpräparation nach der CTAB-Methode

Für die Präparation von Plasmiden wurden entsprechende Einzelkolonien mit sterilen Zahnstochern von den Platten gepickt und in 2 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) für 16-18 h schüttelnd inkubiert. 1,5 ml der Übernachtskulturen wurden für die Plasmidpräparation in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt und für 1 min bei 13000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 200 µl STET-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 10 µl Lysozym und Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen aufgeschlossen. Die Inaktivierung des Enzyms und Abtrennung von der genomischen DNA erfolgte mittels einer Inkubation bei 95 °C für 1 min. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 13000x g zentrifugiert und das Zelltrümmer- und Protein-enhaltende Pellet mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers entfernt. Die Zugabe von 8 µl kationischen Tensid CTAB bewirkt eine selektive Fällung der Plasmid-DNA und damit einhergehende Trennung von Proteinen und/oder Endotoxinen [177]. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei

13000x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl NaCl (1,2 M) resuspendiert und 750 µl Ethanol (99,9 %, raumtemperiert) hinzugegeben. Erneut wurden die Proben für 10 min bei 13000x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und diesmal das Pellet mit 1000 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Es folgte ein letzter Zentrifugationsschritt bei 13000x g für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet. Die getrockneten Proben wurden in 40 µl TE-Puffer aufgenommen, der zur Entfernung von RNA mit RNaseA (Stammlösung 10 mg/ml in Wasser;  $c_E = 2 \mu\text{l/ml}$ ) versetzt war, und für 20 min bei 37 °C inkubiert.

### 2.3.11 Bestimmung von Quantität und Qualität isolierter DNA

Zur Bestimmung der Plasmidkonzentration wurde mit einem Spektralphotometer ein Spektrum von 220 nm bis 300 nm aufgenommen. Für die Messung wurde 1 µl Plasmid auf 50 µl doppelt destilliertem Wasser ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) in eine Quarzküvette pipettiert und zuvor mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  eine Grundlinie erstellt. Der Absorptionswert bei 260 nm wurde zur Konzentrationsberechnung verwendet. Eine  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  von 1 entspricht 50 µg/ml Plasmid bzw. doppelsträngiger DNA.

Die Ratio aus  $\text{OD}_{260\text{nm}} / \text{OD}_{280\text{nm}}$  gibt Auskunft über die Reinheit der isolierten DNA. Werte zwischen 1,8 und 2,0 stehen für eine hohe Reinheit der DNA-Präparation.

Weiterhin kann die DNA-Menge mit Hilfe eines Mengenstandards von AGOWA (LCG Genomics, Berlin) im Agarosegel abgeschätzt werden. 1,2 µl des Standards entsprechen 100 ng DNA.

### 2.3.12 Plasmidpräparation für eine Transfektion

Um genügend Plasmid für eine Transfektion bereitzustellen, das auch Endotoxin-frei ist, wurde Plasmid in *E.coli*-Zellen amplifiziert und nach Angaben des Herstellers mit einem Kit aufgereinigt (EndoFree® Plasmid Maxi Kit, Qiagen).

### 2.3.13 Sequenzierung

Die Vorbereitung der Proben für eine Sequenzierung erfolgte nach Vorgaben des Dienstleisters AGOWA, LCG Genomics, Berlin.

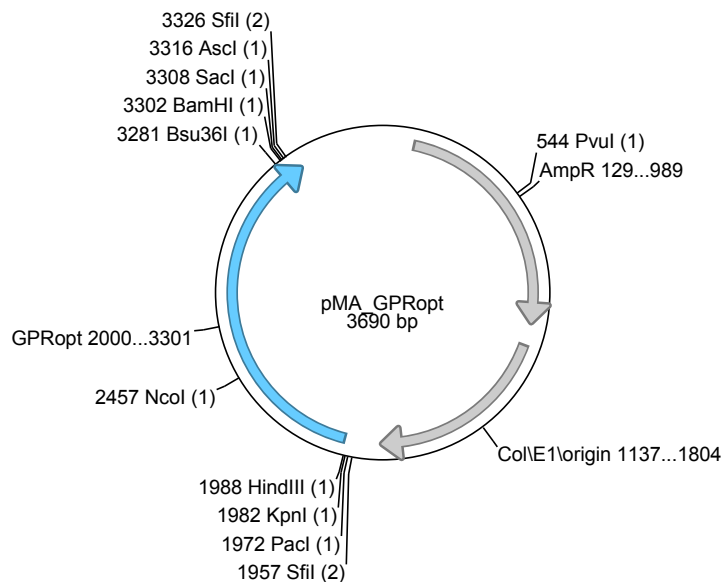
### 2.3.14 Klonierung des Rezeptorkandidaten GPR22

Für die Klonierung des Rezeptors wurde die kodierende Sequenz von GPR22 aus genomischer DNA humaner Proben mittels PCR extrahiert. Als Vorwärtsprimer wurde die Sequenz 5'...TAGCTAGCACCATGTGTTTTCTCCCATCTGGAA...3' verwendet und als Rückprimer die Sequenz 5'...TACTCGAGCTAGTCTGTGACA-ACCTGAGGCACTAAA...3'. Die kodierende Sequenz wurde mit Hilfe des TOPO-TA

Cloning Kits (Invitrogen) amplifiziert und dann für die Expression in verschiedene Expressionsvektoren (pFastBac oder pcDNA3) eingebracht.

### 2.3.15 Codon-Optimierung

Für eine verbesserte heterologe Expression wurde die GPR22-cDNA optimiert. Dafür wurden die Codons innerhalb der kodierenden Region mit häufiger verwendeten Codons, die für die gleiche Aminosäure kodieren, ausgetauscht (siehe Appendix Abbildung 58). Eine solche Veränderung führt zur verbesserten und beschleunigten Translation und erhöht zudem die Stabilität der mRNA. Die Codon-Optimierung wurde von der Firma GeneArt durchgeführt und dann die Codon-optimierte GPR22-Rezeptorsequenz in einem Vektor zur Verfügung gestellt (GPRopt\_pMA; 5 µg lyophilisiert).



**Abbildung 4: pMA-Vektor mit Condon-optimierter Sequenz von GPR22 (GPRopt).**  
Die GPRopt-Sequenz flankieren verschiedene Restriktionsschnittstellen.

### 2.3.16 Anbringen einer Melittinsignalsequenz an GPRopt-Sequenz

Um die Melittinsignalsequenz in den pMA-Vektor einzufügen, wurde der Vektor zunächst durch einen Verdau mit PacI und HindIII linearisiert.

**Tabelle 5: 50 µl Spaltansatz zur Linearisierung des pMA-Vektors mit GPRopt-Sequenz.**

20 µl (2 µg)	pMA-Vektor mit GPRopt
5 µl	NEB Puffer 2
2 µl	PacI
2 µl	HindIII
0,2 µl	BSA (Stammlösung von NEB 100x)
21 µl	Wasser

Dieser Linearisierungsansatz wurde für 90 min in einem Thermoblock bei 37 °C inkubiert. Der gesamte Spaltansatz (50 µl) wurde mit 8 µl Loading-Puffer versetzt und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Die ca. 4 kb große Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und nach Anleitung des innuPREP Gel Extraction Kits von AnalytikJena aufgereinigt. Der linearisierte Vektor wurde am Ende der Aufreinigung in 40 µl Elutionspuffer aufgenommen und die Extraktions-Säule anschließend nochmals mit 10 µl Elutionspuffer gespült.

In Abbildung 5 ist die Sequenz des Oligonukleotids zur Klonierung mit der Melittinsignalsequenz (grau markiert) zu sehen. Die Enden des Oligonukleotids waren mit entsprechenden Überhängen versehen, um eine Ligation mit dem Vektor zu ermöglichen. Mit erfolgreichem Einbringen der Signalsequenz wurde die HindIII-Schnittstelle (magenta) zerstört, während die Restriktionsschnittstelle PacI (blau) nach Einbringen des Oligonukleotids erhalten blieb. Zusätzlich wurde XhoI (gelb) als neue Restriktionsschnittstelle eingefügt. XhoI war für die spätere Umklonierung der modifizierten GPR22-Sequenz in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 (-) für Säugerzellen bzw. den Transfervektor pOET2 für Insektenzellen notwendig.

```

5' ... TAACTCGAGAAAATGAAATTCTTAGTCAACGTTGCCCTTGTTTTT...3'
3' ... TAATTGAGCTCTTTTACTTTAAGAATCAGTTGCAACGGGAACAAAA...5'

5' ... ATGGTCGTATACATTTCTTACATCTATGCGGCCGCTG...3'
3' ... TACCAGCATATGTAAAGAATGTAGATACGCCGGCGCACTCGA...5'

```

**Abbildung 5: Oligonukleotid mit Melittinsignalsequenz.**

Die Melittinsignalsequenz (grau) ist von folgenden Restriktionsschnittstellen flankiert: PacI (blau), XhoI (gelb) und HindIII (magenta).

Bevor die Sequenz in den pMA-Vektor ligiert werden konnte, wurden die Einzelstränge der Melittinsequenz tragenden Oligonukleotide aneinander angelagert. Dazu wurden je 2 µl (100 pmol) vorwärts und rückwärts Oligonukleotide mit 46 µl 1x TAE versetzt und für 5 min bei 90 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt (ca. 90 min). 1 µl des Ansatzes enthielt 2 pmol der doppelsträngigen Oligonukleotide.

Die Ligation erfolgte wie in Abschnitt 2.3.8 beschrieben. Mit 2 µl des Ligationsansatzes wurde eine Transformation in elektrokompetente *E.coli*-Zellen durchgeführt (Abschnitt 2.3.9). Die Zellen wurden auf LB-Agar ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Für eine Plasmidpräparation nach der CTAB-Methode (Abschnitt 2.3.10) wurden einzelne Klone von den Platten gepickt und über Nacht in einer LB-Schüttelkultur inkubiert. Ausgewählte Plasmide wurden sequenziert (AGOWA, LCG Genomics, Berlin).

Mittels CTAB-Methode gewonnenes Plasmid wurde zur Begutachtung auf ein Gel aufgetragen und außerdem eine Testspaltung durchgeführt. Für die Testspaltung wurden die Schnittstellen XhoI (neu eingefügt) und BamHI verwendet. Die daraus entstandenen Fragmente wurden mit einer Größe von 1,3 kb und 2,4 kb vorhergesagt. Im Folgenden ist der Spaltansatz dargestellt:

**Tabelle 6: Ansatz für eine Testspaltung des GP<sub>ROPT</sub> und Melittinsignalsequenz enthaltenen pMA-Vektors**

3,0 µl	DNA aus Plasmidpräparation
1,0 µl	NEB Puffer 3
1,0 µl	XhoI
1,0 µl	BamHI
0,1 µl	BSA (Stammlösung von NEB 100x)
5,0 µl	Wasser

```

      PacI      XhoI      Start Melittin
5' ..          M _ K _ F _ L _ V _ N _ V _ A _ L _ V _ F _ M _ V _ V _ Y _ . 3'
5' .. TTAATTAACTCGAGAAAATGAAATTCTTAGTCAACGTTGCCCTTGTTTTATGGTCGTAT . 3'

                               Start GPROPT
5' .. _ I _ S _ Y _ I _ Y _ A _ A _ A _ E _ L _ A _ T _ M _ C _ F _ S _ P _ I _ L _ E _ . 3'
5' .. ACATTTCTTACATCTATGCGGCCGCTGAGCTTGCCACCATGTGCTTCAGCCCCATCCTGG . 3'

```

**Abbildung 6: pMA-Vektor mit Melittin-Signalsequenz und entsprechenden Übergang zur GP<sub>ROPT</sub>-Sequenz.**

Das Alignment wurde mit Hilfe von <http://nadv.herokuapp.com/> erstellt.

### 2.3.17 Einbringen eines 6x HisTags in die GP<sub>ROPT</sub>-Sequenz

Plasmide, die nach Sequenzierung die richtige Melittinsequenz enthielten, wurden für weitere Klonierungsschritte verwendet. Folgend ist die Oligonukleotidsequenz zu sehen, die das 6x HisTag trägt (grau).

```

5' ... TCAGGTGGTGACAGACCATCACCATCATCATCACTGAG ... 3'
3' ... CCACCACTGTCTGGTAGTGGTAGTAGTAGTACTCCTAG ... 5'

```

**Abbildung 7: Oligonukleotid mit 6x HisTag.**

Das Oligonukleotid mit dem 6x HisTag (grau) ist von folgenden Restriktionsschnittstellen flankiert: Bsu36I (blaugrün) und BamHI (rot).

Mit Hilfe der Restriktionsenzyme Bsu36I und BamHI wurde der pMA-Vektor linearisiert, folgend der Spaltansatz:



**Tabelle 7: 30 µl Spaltansatz zur Öffnung des pMA-Vektors, um eine Ligation mit dem 6x HisTag Oligonukleotid durchzuführen.**

25 µl	pMA-Vektor mit GPRopt + Melittin
3 µl	NEB Puffer 3 + BSA
1 µl	Bsu36I
1 µl	BamHI

Der Spaltansatz wurde für 90 min in einem Thermoblock bei 37 °C inkubiert. Der gesamte Spaltansatz (30 µl) wurde mit Loading-Puffer versetzt und dann eine Gelelektrophorese (1 % Agarosegel) durchgeführt. Die ca. 3,7 kb große Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und nach Anleitung des innuPREP Gel Extraction Kits (AnalytikJena) aufgereinigt. Der linearisierte Vektor wurde am Ende der Aufreinigung in 40 µl Elutionspuffer aufgenommen. Aufgereinigter Vektor wurde für eine Amplifikation in *E.coli*-Zellen verwendet und mittels CTAB-Methode (Abschnitt 2.3.10) Plasmid präpariert.

Folgend ist die GPRopt-Sequenz gezeigt, die nach Klonierung nun am 3'-Ende ein 6x HisTag eingefügt hat:

Bsu36I      6x HisTag      \* BamHI

5'..V\_\_P\_\_Q\_\_V\_\_V\_\_T\_\_D\_\_H\_\_H\_\_H\_\_H\_\_H\_\_H\_\_\*      ..3'

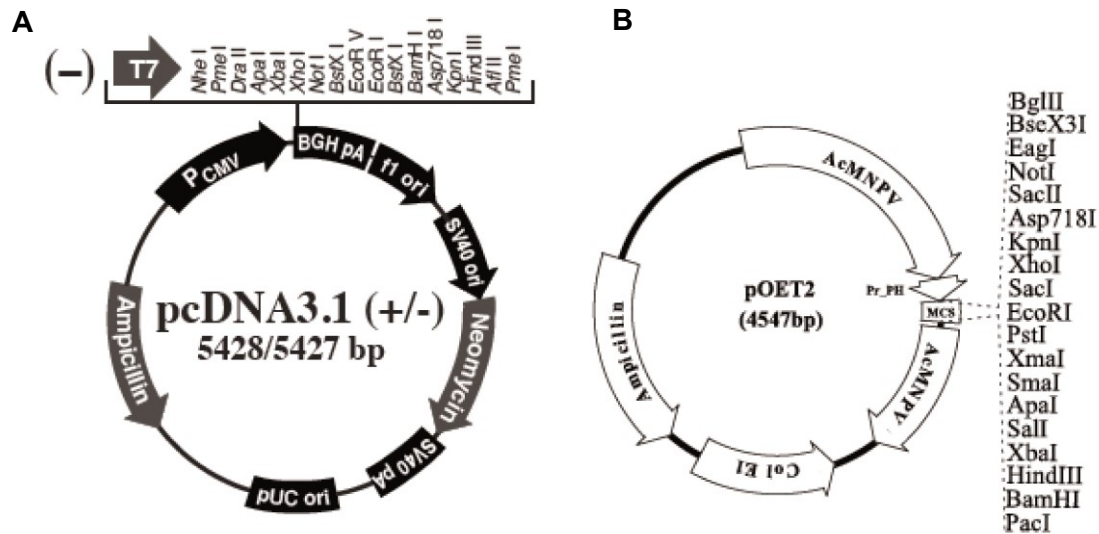
5'..GTGCC**TCAGG**TGGTGACAGACCATCACCATCATCATCACTGA**GGATC**CGAGC..3'

**Abbildung 8: Eingefügte 6x HisTag am 3'-Ende der GPRopt-Sequenz.**

Das Alignment wurde mit Hilfe von <http://nadv.herokuapp.com/> erstellt.

### 2.3.18 Umklonierung von modifiziertem GPRopt in pcDNA 3.1(-) und pOET2

Um die veränderte Rezeptorsequenz in Säuger- oder Insektenzellen heterolog zu exprimieren, war es notwendig die Sequenz in einen dafür geeigneten Vektor zu klonieren. Abbildung 9 A zeigt den verwendeten Expressionsvektor pcDNA 3.1 (-) von Invitrogen für eine Säugerzellexpression. Abbildung 9 B zeigt den Baculovirus-Transfervektor für eine Expression in Insektenzellen (pOET2).



**Abbildung 9: Verwendete Klonierungsvektoren.**

pcDNA 3.1 (-) für eine heterologe Expression in Säugerzellen (A) und der Transfervektor pOET2 für die Insektenzellexpression (B). Für die Umklonierung wurden die Vektoren jeweils mit XhoI und BamHI geschnitten, siehe „multiple cloning site“ in den Vektoren.

Für die Umklonierung wurde die modifizierte GPROpt-Sequenz im pMA-Vektor mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI ausgeschnitten, über eine Gelelektrophorese im Agarosegel isoliert und die DNA aus dem Gel extrahiert (Abschnitt 2.3.7). Auch pcDNA 3.1 (-) und pOET2 wurden mit XhoI und BamHI geschnitten und über ein Gel aufgereinigt. Anschließend wurden die Fragmente durch Ligation miteinander verbunden und in TOP10 elektrokompente *E.coli*-Zellen transformiert. Die in *E.coli*-Zellen amplifizierte Plasmide wurden vor der Transfektion in Säuger- bzw Insektenzellen mit dem EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen) aufgearbeitet (Abschnitt 2.3.12).

## 2.4 Mikro- und zellbiologische Arbeiten

### 2.4.1 Kultivierung von *E. coli*

*E.coli*-Zellen wurden sowohl in LB-Medium als auch auf LB-Agarplatten kultiviert (zum Ansetzen der Lösungen siehe Abschnitt 2.1.10). Plattenkulturen wurden bei 37 °C über Nacht bebrütet. Für Flüssigkulturen wurden einzelne Kolonien von der Platte in 2 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Über die Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin erfolgte eine Selektion Plasmid-tragender Zellen.

### 2.4.2 Kultivierung von Sf9-Zellen

Sf9-Insektenzellen wurden in SF-900TM II -Medium (life technologies), welches zusätzlich mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin (jeweils Invitrogen) versetzt war, kultiviert. Für die Stammhaltung wurden die Zellen alle zwei Tage passagiert. Zum Umsetzen der Zellen wurde zunächst mit Hilfe einer Neubauerkammer die Zellzahl der Kultur ermittelt. Für die Zählung wurden die Zellen 1:1 mit Trypanblau (Sigma) gefärbt, um vitale von toten Zellen zu unterscheiden. Vor dem Umsetzen sollte die Zellzahl nicht mehr als  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml betragen, damit sich die Zellen noch in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Für eine Weiterkultivierung wurden die Zellen nach der Zählung entsprechend mit Medium auf  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. 100 ml dieser Zellsuspension wurden dann in einen sterilen 500 ml-Erlenmeyerkolben überführt. Die Haltung der Zellen erfolgte in Schüttelkulturen bei 27 °C und 120 rpm (CERTOMAT® HK, B. BRAUN).

Für die Vermehrung von Baculoviren, die Virustiterbestimmung, sowie die Proteinexpression (GPRopt) wurden Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml) verwendet.

### 2.4.3 Herstellung rekombinanter GPRopt/Baculoviren

Zur Herstellung von Baculoviren wurde das flashBACULTRA-System von Oxford Expression Technologies verwendet. Dazu wurde die modifizierte GPRopt-Rezeptorsequenz in den Transfektor pOET2 kloniert (siehe Abschnitt 2.3.18). Für die Transfektion von Insektenzellen wurde in *E.coli* amplifizierter und aufgereinigter Vektor verwendet. 1 h vor Transfektion der Sf9-Zellen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 2 ml Medium auf eine 35 cm Schale ausgesät. In der Zwischenzeit wurde der Transfektionsansatz vorbereitet:

1 ml	Serum- und Antibiotika-freies Medium
5 µl	Transfektionsmittel Lipofectin® (Invitrogen)
5 µl	flashBAC DNA (enthält „bacterial artificial chromosome“ (BAC), 5 µl entsprechen 100 ng)
500 ng	Transfektor (pOET2 mit modifiziertem GPRopt bzw. zur Kontrolle ohne GPRopt = Leervirus)

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen sanft mit Serum- und Antibiotika-freiem Medium gewaschen und dann tropfenweise mit dem Transfektionsansatz versehen. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht bei 27 °C inkubiert und am folgenden Tag erneut mit 1 ml Medium versetzt und so weitere 5

Tage kultiviert. Während der ersten Inkubationszeit erfolgte eine homologe Rekombination des Zielgens in die Virus-DNA, wodurch rekombinanter Virus entstand. Nach fünf Tagen Inkubationszeit der Sf9-Zellen mit rekombinanten Virus wurde Kulturmedium abgenommen, welches freigesetzten Virus enthielt, den sogenannten Primärvirus. Dieses Aliquot diente zunächst zur Amplifikation des Virus in einer Sf9-Suspensionskultur. Dafür wurden 50 ml Suspensionskultur mit einer Zelldichte von  $2,0 \times 10^6$  Zellen/ml mit 100 µl Primärvirus infiziert und für 2 Tage kultiviert. Gut infizierte Zellen sehen insgesamt vergrößert aus und haben auch einen vergrößerten Zellkern, außerdem nimmt die Vitalität der Zellen ab. Das Kulturmedium mit dem amplifizierten Virus wurde geerntet und bei 3000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert, dekantiert und letztlich steriltfiltriert. Der Virus ist abgedunkelt bei 4 °C für ca. 6 Monate lagerfähig.

#### 2.4.4 Bestimmung des Titers der rekombinanten GPRopt/Baculoviren

Vor dem Einsatz des Virus im Experiment wurde der Virustiter des GPRopt/Baculovirus und des Leervirus bestimmt. Dazu wurden Sf9-Zellen mit verschiedenen Verdünnungen des amplifizierten Virus infiziert. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/well in eine 12-well-Schale ausgesät. Nach Absetzen der Zellen für 1 h wurden die Zellen mit 1 ml frischem Medium versetzt und dann mit unterschiedlichen Mengen Virus infiziert und für 48 h bei 27 °C inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen am Mikroskop begutachtet. Die Menge an Virus in µl, die zu einer vollständigen Infektion der Sf9-Zellen in einem Well geführt hatte, wurde zur Berechnung des Virustiters (pfu/ml) herangezogen. Folgend ein Beispiel:

$$5 \times 10^5 \text{ Zellen} / 0,005 \text{ ml Inokulum} = 1 \times 10^8 \text{ pfu/ml}$$

Der Virustiter der Viren lag für GPRopt bei  $2,5 \times 10^9$  pfu/ml und beim Leervirus bei  $1 \times 10^9$  pfu/ml. Die Menge an Virus, mit der eine Sf9-Insektenkultur für eine heterologe Expression infiziert wird - das Inokulum - errechnet sich aus der „multiplicity of infection“ (MOI), der absoluten Zellzahl und dem Virustiter.

$$\text{Inokulum [ml]} = (\text{MOI [pfu]} \times \text{absolute Zellzahl}) / \text{Virustiter [pfu/ml]}$$

#### 2.4.5 Heterologe Expression der GPRopt/Baculoviren in Sf9-Zellen

Für die heterologe Expression wurden Sf9-Zellen bei einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml (100 ml Kulturvolumen) mit GPRopt-Virus infiziert. Zur Kontrolle wurden die Zellen auch mit Leervirus infiziert. Für Expressionskontrollen wurden die infizierten Zellen jeweils nach 24 h, 48 h und 72 h geerntet. Dafür wurden 5 ml Suspensionskultur bei 500x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, in Puffer (50 mM

Tris/HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA) aufgenommen, einmal mit PBS gewaschen und letztlich in 100 µl PBS für die Proteinanalysen aufgenommen.

#### **2.4.6 Kultivierung von HEK293 Zellen**

Die adhärenenten Säugerzellen HEK293 wurden bei 37 °C im Brutschrank unter 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Zur Kultivierung wurde DMEM (low glucose, GlutaMAX, Invitrogen) verwendet, das zusätzlich 10 % FBS und 50 U/ml Penicillin sowie 50 µg/ml Streptomycin (jeweils Invitrogen) enthielt.

Bei einer Konfluenz von 90-100 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml frischem Medium versorgt. Da HEK293-Zellen nur leicht adhärenent sind, konnten die Zellen mittels einer 10 ml Pipette von der Platte gespült und in dem Medium resuspendiert werden. 1 ml dieser resuspendierten Zellen wurde dann auf eine neue 10 cm Schale überführt, die 9 ml frisches Medium enthielt. Dies entspricht dem Splitten der Zellen in einem Verhältnis von 1:10. Die Zellen wurden jeden zweiten Tag passagiert.

GPRopt exprimierende Klone wurden aufgrund eines verlangsamten Wachstums nur in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 gesplittet und enthielten zusätzlich 400 µg/ml G418 zur Selektion stabil transfizierter Klone.

#### **2.4.7 Heterologe Expression von GPRopt in HEK293 Zellen**

Die heterologe Expression des mit Melittinsignalsequenz und 6x HisTag modifizierten GPRopts fand in adhärenenten HEK293-Zellen (Invitrogen) statt.

Mittels Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers mit Plasmid transfiziert. Nach 2 h Inkubationszeit im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel auf normales Kulturmedium. 24 h nach Transfektion wurde auf Medium mit 400 µg/ml des Antibiotikums G418 gewechselt. Dies diente der Selektion der Zellen zur Erzeugung einer stabilen Zelllinie. Ein im Plasmid enthaltendes Resistenzgen sollte nur Zellen die Plasmid aufgenommen hatten, ermöglichen sich unter dem Selektionsdruck weiter zu vermehren. Dazu wurden die Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 90 % vereinzelt und weiter unter Selektionsdruck kultiviert. Für Expressionsanalysen wurden mRNA- und Proteinproben von diesen Zellen gewonnen.

### **2.5 Herstellung Peptid-spezifischer Antikörper**

Zur Identifizierung von GPR22-Protein im Western Blot wurde ein Peptid-spezifischer Antikörper hergestellt. Das für die Immunisierung verwendete Peptid NH<sub>3</sub>-CAVKRHERRERQKR-Amid entspricht den Aminosäuren 297 - 310 der humanen

GPR22-Rezeptorsequenz. Die Sequenz befindet sich in der dritten intrazellulären Schleife des 7-transmembranspannenden Proteins und weist 100 % Homologie zu den Spezies Maus und Ratte auf. Die Peptidsynthese wurde von der Firma BIOSYNTHAN GmbH und die folgende Immunisierung von Kaninchen mit dem Peptid von der Firma Biogenes GmbH durchgeführt. Es erfolgten fünf Immunisierungszyklen mit dem Peptid, bevor Gesamt-IgG mittels Affinitätschromatographie (Protein A - Säule) aus Serum des immunisierten Kaninchens gewonnen wurde. Dieser anti-GPR22 Antikörper, im folgenden CAVK-Antikörper genannt, wurde für Western blot Analysen verwendet.

## **2.6 Biochemische Methoden**

### **2.6.1 Proteinaufarbeitung für Western blot**

Für eine Proteinanalyse wurden NRKMs (Zellisolation und Kultivierung siehe Abschnitt 2.8) einmal vorsichtig mit kaltem PBS gewaschen und dann in 1 ml PBS auf Eis von der Kulturschale abgeschabt. Die abgeschabten Zellen wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt und zentrifugiert (14000 rpm, 2 min, 4 °C). Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen und das Pellet in 30 - 200 µl PBS aufgenommen (PBS plus 40 µl/ml Protease Inhibitor-Cocktail (Complete, Roche) und 1 µg/ml Phosphatase Inhibitor NaF). Nach drei Zyklen von Einfrieren in Flüssigstickstoff und Auftauen wurden 10 µl jeder Probe für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (Abschnitt 2.1.11.1) abgenommen und in 390 µl 1 N NaOH verdünnt. Letztlich wurden die Proben 1:1 mit Probenverdünnungspuffer (Abschnitt 2.1.11.2) versetzt und für 5 min bei 65 °C inkubiert.

Sf9-Zellen wurden in ähnlicher Weise aufgearbeitet. 10 ml der Suspensionskultur wurden dabei für die Proteinaufarbeitung verwendet. Die Zellen wurden für 10 min bei 500x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zwei Mal mit 5 - 1 ml 1x PBS gewaschen. Letztlich wurde das Pellet in TE-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 40 µg/ml Proteinase-Inhibitor Cocktail (Roche)) aufgenommen. Die Zellen wurden mit einem 2 ml-Teflonpotter homogenisiert und die Protein-konzentration des Homogenats mittels Lowry-Methode bestimmt. Für Western blot Analysen wurde das Zellhomogenat zunächst für 10 min bei 600x g, 4 °C und dann der Überstand erneut für 25 min bei 50000x g, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert.

### 2.6.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Lowry [178]. Die Probe wird dabei bei einer Wellenlänge von 750 nm am Spektralphotometer gemessen. Die Extinktionseinheiten sollten im Bereich zwischen 0,15 und 0,4 liegen. Für die Messung wurden die Proben in 0,1 N NaOH 1:200 vorverdünnt. Dementsprechend erfolgte auch die Leerwertmessung mit 0,1 N NaOH. Weiterhin wurde BSA mit definierter Konzentration (100 µg/ml Stammlösung) als Referenzwert verwendet, von dem unter Berücksichtigung der Verdünnung und der Schichtdicke  $d = 1$  die Proteinkonzentration ermittelt werden konnte.

Für die Messung wurden Doppelwerte angefertigt. 200 µl der vorverdünnten Probe, des Leerwertes und des Standards wurden mit frisch hergestellter Lösung 1 versetzt, kurz gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der frisch hergestellten Lösung 2 hinzugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben spektralphotometrisch gemessen.

### 2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte nach Laemmli [179]. Dazu wurden SDS-Gradientengele (PAGE® Gold Precast Gels, Polyacrylamide, 4-20% Glycerine) von Lonza und Elektrophoreseapparaturen von BioRad verwendet. Vor Beladung des Gels wurden die Proben mit 4x Roti-Load (reduzierend, Carl Roth) oder Probenverdünnungspuffer (Abschnitt 2.1.11.2) versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert bzw. 15 min bei 60 °C. 20 µg einer Proteinprobe und SeeBlue®-Marker als Standard wurden auf das Gel aufgetragen und in Laufpuffer für 1,5 h bei konstanter Spannung von 120 V aufgetrennt.

### 2.6.4 Western Blot

Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE (Abschnitt 2.6.3) wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Carl Roth) transferiert. Dafür wurden die Gele für 10 min in Transferpuffer (Abschnitt 2.1.11.2) equilibriert. Dieser Waschschrift diente dem Herauswaschen von SDS aus den Gelen. Während dieser Zeit wurde die PVDF-Membran in 99,9 % Ethanol aktiviert. Nach Inkubationszeit wurden Gel und Membran zwischen Transferpuffer-getränkte Filterpapiere im Stapelverfahren in eine Transferapparatur (BioRad) gelegt. Bei konstantem Strom von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> erfolgte der Proteintransfer auf die PVDF-Membran für 90 min. Danach wurde die Membran für 5 min in Ponceau-Lösung zur Kontrolle des Transfers inkubiert und dann dreimal mit ausreichend A. bidest gewaschen.

Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte mittels einer Immunreaktion. Dazu wurde die Membran zunächst für 1 h in Blocklösung (5 % Magermilch in Waschpuffer ohne Tween20) leicht schwenkend inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Es folgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper (anti-GPR22 (Novus Biologicals) 1:4000; anti-GPR22 1:7500 (CAVK-Antikörper); anti-Polyhistidin (Sigma) 1:2000) zur spezifischen Erkennung des Rezeptors in 1 % Magermilch/Waschpuffer bei 4 °C leicht schwenkend über Nacht. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit ausreichend Waschpuffer erfolgte erneut eine Inkubation für 1 h mit Blocklösung. Letztlich wurde die Membran mit sekundären Antikörper, den sogenannten Detektionsantikörper, in 1 % Magermilch/Waschpuffer für 90 min leicht schwenkend inkubiert. Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppeltes Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG (Sigma Aldrich) kamen als Detektionsantikörper zum Einsatz. Nach dreimaligen Waschen für 10 min mit reichlich Waschpuffer wurden die Membranen mit Chemilumineszenz-Substrat (Lumigen, Amersham Biosciences) für 10 min inkubiert. Das Substrat kann von der an dem Antikörper gekoppelten Peroxidase umgesetzt werden und erzeugt Chemilumineszenz. Diese Chemilumineszenz dient dazu einen Hyperfilm-HCL® (Amersham Biosciences, GE Healthcare) zu belichten. Das anhand der Aminosäuresequenz errechnete Molekulargewicht für den humanen Rezeptor GPR22 liegt bei 49 kDa und für den Ratten- bzw. Mausrezeptor bei 53 kDa.

### **2.6.5 Beschichtung von Deckgläschen**

Für die Färbung von Zellen war es zunächst notwendig Deckgläschen (Fisher Scientific) mit Fibronectin (1:100 in PBS; Millipore) zu beschichten. 400 µl der Fibronectin-Lösung wurden auf jedes mit einem Deckgläschen bestückten Well (24-Well-Palitte) verteilt. Die Deckgläschen wurden bei 37 °C im Brutschrank für mindestens 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Fibronectin-Lösung abgesaugt und die Deckgläschen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden in jedes Well 20.000 Zellen in 500 µl Medium ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

### **2.6.6 Plasmamembranfärbung**

Für die Membranfärbung wurden Zellen wie in Kapitel 2.6.5 beschrieben vorbereitet. Am nächsten Tag wurden die Zellen vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln mit 500 µl Natriumperiodatlösung inkubiert. Die an plasmamembranständigen Kohlenhydraten vorkommenden Hydroxylgruppen werden durch Natriumperiodat zu Aldehydgruppen oxidiert. Nach Inkubation wurden die Zellen zunächst einmal mit 1x PBS gewaschen und dann einmal mit Natriumacetat-



Puffer. Es folgte eine Inkubation der Zellen für 30 min im Dunkeln mit 500 µl N-Biotin-Hydrazid-Lösung, wodurch eine Biotinylierung der Kohlenhydratreste durch Reduktion der Aldehyde mit Hydrazid erfolgte. Diese Reaktion entspricht einer Schiff'schen Basen-Bildung. Nun wurden die Zellen zunächst einmal mit Natriumacetat-Puffer und einmal mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 15 min mit 500 µl 4 % Paraformaldehyd fixiert. Vor einem letzten Mal mit 1x PBS waschen erfolgte eine Inkubation mit 500 µl Ammoniumchlorid-Puffer für 10 min bei Raumtemperatur, um verbleibendes Paraformaldehyd durch Reaktion der Aldehydgruppen mit den Ammoniumionen zu entfernen.

### **2.6.7 Immunzytochemie**

Zur Färbung von Zellen wurden diese zunächst auf Fibronectin beschichtete Glasdeckgläschen (DG; Ø 12 mm, Fisher Scientific) ausgesät und für 2 - 3 Tage in einer 24-well-Platte kultiviert. Nachdem die Zellen mit 1x PBS gewaschen wurden, wurden sie für 15 min mit 4 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert und dann erneut 3x mit PBS gewaschen. Um das Binden intrazellulärer Domänen für die Antikörper zu ermöglichen, wurden die Zellen 4 min mit 0,2 % Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 5 % BSA in PBS um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Für die Inkubation der Zellen mit Primärantikörper wurde ein Tropfen (50 µl) entsprechend verdünnter Antikörper (in 1 % BSA) auf Parafilm pipettiert und die DG mit der Zellseite darauf gelegt. Der Primärantikörper wurde bei Raumtemperatur für 60 - 90 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die DG wieder in die Wells überführt und 3x mit PBS gewaschen. Der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) markierte Sekundärantikörper wurde ebenfalls in 1 % BSA verdünnt und wie für den Primärantikörper beschrieben mit den Zellen für 45 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen wieder 3x mit PBS gewaschen und dann 10 min mit DAPI (Vectorshield plus DAPI) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die gefärbten Zellen mit einem Tropfen (ca. 10 µl) Mowiol 4-88 (Carl Roth) auf Objektträgern eingedeckelt und vor der mikroskopischen Begutachtung mindestens eine Nacht im Kühlschrank zur Aushärtung gelagert.

## **2.7 Mikroskopie**

Die Analyse der gefärbten Zellen fand am Konfokalmikroskop statt (LSM700, Carl Zeiss). Es wurde ein 63x Objektiv (Plan-Apochromat 63x/NA 1,4 Immersionsöl Ph3) verwendet. Die folgende Tabelle zeigt die verwendeten Detektionsfluorochrome, die Laser zur Anregung der Fluoreszenz und die Filter.

**Tabelle 8 zeigt die Wellenlängen der verwendeten Laser zur Anregung der Detektionsfluorochrome und die angewandten Filtersets zur Detektion.**

Fluorochrom	Laser (Wellenlänge)	Filter
Cy <sup>TM</sup> 3	555 nm	LP 490
Fluorescein (FITC)	488 nm	SP 555
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	405 nm	SP 490

## 2.8 Bioassay mit neonatalen Rattenkardiomyozyten

Zur Untersuchung der biologischen Aktivität von EPA, dessen CYP-abhängigen Epoxymetaboliten 17,18-EEQ und synthetischen 17,18-EEQ Analoga haben wir ein bereits etabliertes Zellmodell gewählt. Kang und Leaf führten 1994 ein Zellmodell auf der Basis kultivierter neonataler Rattenkardiomyozyten (NRKMs) ein, um den Effekt von n-3 PUFAs auf die Kontraktion von Zellen zu untersuchen [21]. Das Zellmodell erfüllte eine Reihe von Kriterien zur Untersuchung anti-arrhythmischer Effekte: (i) auf eine erhöhte extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sowie  $\beta$ -adrenerge Stimulation mittels Isoproterenol reagierten die Zellen mit Tachykardien. Das irreguläre und asynchrone Schlagen der Zellen als Antwort auf arrhythmogene Substanzen stellte das *in vitro* Äquivalent zum Herzflimmern *in vivo* dar, (ii) die Kardiomyozyten zeigten einen Abfall der Schlagfrequenz unter Basalbedingungen (negativ chronotroper Effekt) nach Zugabe von EPA oder DHA, (iii) durch Vorinkubation mit EPA oder DHA konnten die Arrhythmien verhindert werden.

Für den Bioassay wurden NRKMs aus 1 - 2 Tage alten Wistar Ratten (E.R.D.E. e.V.) isoliert, in Flaschen (Falkon, 12,5 cm) ausgesät und in 2 ml Halle SM20-I Medium (Biochrom AG) kultiviert, das mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum und 2  $\mu\text{M}$  Fluorodeoxyuridine versetzt war. Eine Präparation von Kardiomyozyten enthält immer auch Nichtmuskelzellen, wie z.B. Fibroblasten. Das im Medium enthaltene Fluorodeoxyuridine unterdrückt das Wachstum dieser sich noch teilenden Zellen. NRKMs hingegen sind nicht mehr in der Lage sich zu teilen. Spontan schlagende Zellhaufen traten nach ca. 4 - 6 Tagen in Kultur auf (120-150 Kontraktionen/min, Messung am Inversmikroskop bei 37 °C). Die Schlagfrequenz wurde von 6 - 8 individuellen Zellhaufen einer Flasche 5 min vor und nach Zugabe der Substanz(en) gemessen. Basierend auf der Differenz der Schlagfrequenz unter basalen Bedingungen und nach Substanzzugabe wurden die chronotropen Effekte (veränderte Schlagfrequenz/ min) ermittelt und werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben; n=18 - 40 Zellhaufen stammen aus mindestens drei unabhängigen NRKM Kulturen. Alle Testsubstanzen wurden in 1000facher Stammlösung in Ethanol hergestellt und mit einer Endkonzentration von 30 nM getestet. EPA gilt dabei als

Ausnahme, es wurde in einer Endkonzentration von 3,3  $\mu\text{M}$  eingesetzt und zudem 30 min statt 5 min vorinkubiert. Die Messung der Schlagfrequenz von NRKMs wurde in Kooperation mit Dr. Gerd Wallukat durchgeführt.

### **Agonisten und Antagonisten**

17,18-EEQ Analoga wurden wie in [180] beschrieben von unserem Kooperationspartner John R. Falck (UT Southwestern, Dallas, Texas, USA) synthetisch hergestellt. EPA, 17,18-EEQ und 11,12-EET wurden bei Cayman Chemicals erworben. Die R,S- und S,R-Enantiomere wurden durch Auftrennung der entsprechenden razemischen Gemische mit Chiralphasen-HPLC gewonnen [180]. Alle Analoga von 17,18-EEQ wurden mit einer Endkonzentration von 30 nM eingesetzt und für 5 min vorinkubiert. Die Vehikelkontrolle (0,1 % Ethanol) zeigte unter gleichen Bedingungen keinen Effekt auf die Schlagfrequenz der NRKMs.

### **Pharmakologische Interventionsstudien**

Mit Hilfe pharmakologischer Interventionen konnte die Bedeutung von beteiligten Signalwegen und deren Komponenten aufgeklärt werden. Dazu wurden die NRKMs vor der Messung u.a. für vier Stunden mit 100 ng/ml Pertussistoxin, ein Inhibitor für G $\alpha$ -Proteine, inkubiert. Pertussistoxin katalysiert die ADP-Ribosylierung des C-terminalen Cystein-Restes der  $\alpha$ -Untereinheit von G-Proteinen (G $\alpha$ i, G $\alpha$ o, and G $\alpha$ t) [181]. Dies verhindert die Interaktion der G-Proteine mit Rezeptoren und somit auch deren Aktivierung. Da die G $\alpha$  Untereinheiten in einem inaktiven, GDP-bindenden, Status verbleiben, können sie die Adenylatzyklase nicht inaktivieren oder sind nicht mehr an der Öffnung von Kalium-Kanälen beteiligt. Weiterhin wurden H89, ein Inhibitor der cAMP-aktivierten Proteinkinase A (PKA), und der unspezifische Prostanoidrezeptor-Antagonist AH6809 eingesetzt, der mit einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  5 min vor der Messung auf die Zellen gegeben wurde. Calphostin C, ein hoch spezifischer Inhibitor der Proteinkinase C (PKC), wurde mit einer Endkonzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  ebenfalls 5 min vor der Messung dazugegeben.

Isoproterenol ist ein synthetisches Katecholamin, das sowohl  $\beta$ 1- als auch  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptoren stimuliert. Die Substanz hat eine Erhöhung der inotropischen und chronotropischen Aktivität im Herzen zur Folge. Isoproterenol (1  $\mu\text{M}$ ) wurde auf NRKMs angewendet, um einen positiv chronotropen Effekt auszulösen.

Alle genannten Chemikalien wurden von Sigma Aldrich erworben.

### **Reduktion der GPR22-Expression**

NRKMs wurden für eine verminderte Expression des Rezeptors mit zwei unterschiedlichen Rezeptor-spezifischen siRNAs (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Tabelle 9) von QIAGEN

(HP GenomeWide siRNAs) unter Verwendung des Transfektionsreagenz GenomOne™-Neo EX (Cosmo Bio Co. LTD) transfiziert. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

**Tabelle 9: Verwendete siRNA-Paare zur Reduktion der GPR22-Expression**

siRNA Paar eins	vorwärts	r(GGCUCUUAUAUCCGGAUA)dTdT
	rückwärts	r(UAUCCGGAUAUUAAGAGCC)dTdT
siRNA Paar zwei	vorwärts	r(GCGAGUUGUUUCCAUU)dTdT
	rückwärts	r(AACUAUGGAAACAACUCGC)dTdT

Die Veränderung in der Schlagfrequenz in Antwort auf CYP-abhängige Metabolite wurde 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion gemessen. Als Kontrolle dienten NRKMs, die nicht mit siRNA transfiziert waren. Vergleichend zur siRNA wurden Rezeptor-spezifische antisense Oligonukleotide (5'...GACATTCCTCCCACC-ACTGCT...3') hergestellt (BIOTEZ GmbH) und mit einer Endkonzentration von 1 µM auf die Zellen für 48 h und 72 h angewendet. Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel mit dem Zusatz von 1 µM Oligonukleotiden. Zellen, die mit scrambled Oligonukleotiden (5'...CACCGCTCAACTCCCTCAT...3') transfiziert wurden, dienten als Kontrolle. Die Testung verschiedener Transfektionsreagenzien mit FITC-markierten Oligonukleotiden ergab, dass eine Transfektion von NRKMs mit den Oligonukleotiden ohne Transfektionsmittel am effektivsten war. Daher wurden sowohl antisense als auch scrambled Oligonukleotide ohne Transfektionsmittel transfiziert.

## 2.9 Ligandenbindungstests

Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden maßgeblich mit der Hilfe von Ramona Zummach (AG Schunck) durchgeführt.

### 2.9.1 Chemische Epoxidation von <sup>3</sup>H-Arachidonsäure

Für die Ligandenbindungstests wurde der verwendete Ligand [<sup>3</sup>H]-14,15-EET selbst hergestellt. Dafür wurde [<sup>3</sup>H]-Arachidonsäure (Hartmann, ART-0196-1 Arachidonic Acid [5,6,8,9,11,12,14,15-(3H/N)], spezifische Aktivität 200-240 Ci/mmol; Konzentration 1 mCi/ml) chemisch oxidiert. 125 µl [<sup>3</sup>H]-Arachidonsäure (= 125 µCi = 277,5 Mio DPM) wurden dafür mit 5 ml Methylenchlorid und 60,4 µl 3-Chlorperbenzoesäure (32 mg/ml) versetzt und für 1 h abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 5,3 µl Dimethylsulfid gestoppt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Ansatz im Rotationsverdampfer eingengt und letztlich in 500 µl Ethanol aufgenommen.

### 2.9.2 Gewinnung von $^3\text{H}$ -14,15-EET Enantiomeren mittels HPLC

Die verwendete „high performance liquid chromatography“ (HPLC) – Anlage (Shimadzu) war mit einem Systemkontroller SCL-10A, zwei LC10AD Pumpen, dem gekühlten automatischen Probengeber SIL-10AD, einem Säulenofen CTO-10AS und einem UV-Detektor SPD-M10A ausgestattet. Radioaktivität wurde mit einem Radioflow Detektor von E&G Berthold gemessen. Für die „reverse phase“ (RP)-HPLC wurde eine Nucleosil 100-5C18HD Säule (Macherey & Nagel) verwendet.

Bei der chemischen Oxidation von Arachidonsäure entstehen verschiedene Regioisomere. Für die Ligandenbindungsstudie hingegen war nur das 14,15-EET von Interesse. Aus diesem Grund wurde die chemisch oxidierte  $^3\text{H}$ -Arachidonsäure über die RP-HPLC geschickt. Dies geschah in 40  $\mu\text{l}$  Fraktionen. Der RP-HPLC Lauf wurde mit einem linearen Gradienten von Wasser: Acetonitril: Essigsäure (49,95: 49,95: 0,1 (vol/vol/vol)) durchgeführt. Das bei einer Retentionszeit von ca. 22,5 min auftretende  $^3\text{H}$ -14,15-EET wurde separat aufgefangen und lag als razemisches Gemisch vor. Eluiertes, razemisches  $^3\text{H}$ -14,15-EET wurde sofort im Rotationsverdampfer eingeeengt, da die im Laufmittel befindliche Essigsäure zu einer Hydrolyse des Metaboliten geführt hätte.

Die Konformation des Metaboliten kann ebenfalls eine Rolle bei der Rezeptorbindung spielen. Deshalb sollten die Stereoisomere vom  $^3\text{H}$ -14,15-EET (R,S und S,R) einzeln in ihrer Bindungskapazität getestet werden. Die Gewinnung der  $^3\text{H}$ -14,15-EET Enantiomere erfolgte mittels Chiralphasen-HPLC.  $^3\text{H}$ -14,15-EET wurde über eine Chiral OD Säule (250 x 4,6 mm; Diacel) isokratisch unter Verwendung von Hexan: Isopropanol: Essigsäure (99,65: 0,3: 0,05 (vol/ vol/ vol)) als Laufmittel aufgetrennt. Die Stereoisomere wurden separat aufgefangen, wobei  $^3\text{H}$ -14(S),15(R)-EET ( $R_t$ = ca. 57 min) vor  $^3\text{H}$ -14(R),15(S)-EET ( $R_t$ = ca. 60 min) eluierte. Auch die Stereoisomere wurden sofort im Rotationsverdampfer eingeeengt und letztlich in Ethanol aufgenommen. Für die Anwendung der Substanzen im Test wurde eine Konzentration von 100.000 DPM pro 1  $\mu\text{l}$  eingestellt.

### 2.9.3 Bindungstests

Zunächst wurden die Substanzen für die Inkubation mit den Zellen vorbereitet. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung mit den Substanzen, woraus sich folgende Ansätze ergaben. Als Ligand wurden sowohl  $^3\text{H}$ -14(S),15(R)-EET als auch  $^3\text{H}$ -14(R),15(S)-EET eingesetzt. Pro Well sollte eine Radioaktivität von 100.000 DPM verwendet werden.

**96  $\mu\text{l}$  PBS                    + 3,3  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Ligand                    + 1,1  $\mu\text{l}$  Zusatz**

1	Ligand	14,15-EET ( $c_E = 10 \mu\text{M}$ )
2	Ligand	17,18-EEQ ( $c_E = 100 \text{ nM}$ )
3	Ligand	Ethanol

Die Inkubation der Substanzen mit den Zellen wurde in einer 96-Well-Filterplatte (MSF BN6B, Millipore) durchgeführt.

Im Bindungstest wurden sowohl GPRopt heterolog exprimierende Insektenzellen als auch Säugerzellen untersucht. 45 ml Insektenzellkulturen wurden mit GPRopt Virus oder Leervirus mit einer MOI von 2 infiziert und für 48 h inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen zunächst auf eine 10 cm Schale ausgesät und für 1 -2 h stehen gelassen. Dann wurden die Zellen 4x mit PBS gewaschen, um tote Zellen abzuwaschen. Die vitalen Zellen wurden von der Platte abgespült und in 2 ml PBS aufgenommen. Spektralphotometrisch wurde die optische Dichte der Zellsuspension gemessen und für GPRopt Zellen sowie für Leervirus infizierte Zellen auf eine  $OD_{600\text{nm}}$  von ~1 eingestellt.

Für die Untersuchung von GPRopt heterolog exprimierenden HEK293-Zellen wurde eine konfluente 10 cm Schale verwendet. Als Kontrolle diente der HEK293-Wildtyp-Stamm (WT). Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, in 2 ml PBS aufgenommen und letztlich auf eine  $OD_{600\text{nm}}$  von ~1 eingestellt.

30  $\mu\text{l}$  der vorbereiteten Substratansätze wurden pro Well vorgelegt. Mit Zugabe von 70  $\mu\text{l}$  Zellsuspension pro Well wurde die Inkubationszeit von 10 min auf Eis gestartet. Nach Inkubation wurde der Ansatz abgesaugt und 2x mit 200  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen und wieder abgesaugt. Die Platte wurde für 1 h bei Raumtemperatur unter der Laminarbox getrocknet und dann mit 40  $\mu\text{l}$  Szintillationsflüssigkeit pro Well versehen. Nach einer weiteren Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur wurde die Platte mit dem TopCount Scintillation Counter (PerkinElmer) gemessen.

## 2.10 Statistische Auswertung

### 2.10.1 Statistische Auswertung für die klinische Studie

Vor Analyse der Daten wurde eine Häufigkeitsverteilung des Omega-3 Index von allen Individuen, die an der Voruntersuchung teilgenommen hatten, durchgeführt (GraphPad Prism 5.0). Von insgesamt 38 Teilnehmern wurden 20 für die Studie ausgewählt, da sie wie als Einschlusskriterium definiert einen Omega-3 Index von < 6 aufwiesen. Ein Studienteilnehmer (Omeicos26) wurde allerdings von allen weiteren Datenanalysen ausgeschlossen, da ein Nichteinhalten des Studienprotokolls vermutet wurde (insgesamt  $n=19$ ).

Die folgenden statistischen Analysen wurden mit PAWS Statistics 18, SPSS Inc. durchgeführt. Zunächst wurden die Daten auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov Test untersucht. Um den Einfluss der EPA/DHA-Supplementierung auf die Probanden zu untersuchen, wurden die Daten mittels allgemeinen linearen Modells für Mehrfachmessung untersucht. Anschließend erfolgte ein Posthoc Test basierend auf geschätzten Randmitteln und einer Korrektur der Signifikanzniveaus nach der Holm-Bonferroni-Prozedur. Ein möglicher Geschlechterunterschied wurde mit Hilfe eines t-Tests für unabhängige Stichproben ermittelt. Für  $p < 0,05$  wurde ein statistisch signifikanter Unterschied angenommen. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte sowohl in Säulendiagrammen als auch mit Hilfe von Liniendiagrammen. Die dargestellten Werte aus der klinischen Studie sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben.

Um die relative Effizienz des Umsatzes der Vorläuferfettsäuren (EPA/AA bzw. DHA/AA) zu den entsprechenden CYP-abhängigen Epoxymetaboliten und korrespondierenden Diolen zu untersuchen, wurden diese miteinander korreliert ((EEQs+DHEQs)/(EETs+DHETs) bzw. (EDPs+DHDPs)/(EETs+DHETs)). Als Grundlage der Korrelation dienten entsprechende Daten zu allen Messpunkten der Studie. Korrelationsanalysen wurden entsprechend der Verteilung der Stichprobe nach Pearson oder Spearman-Rho durchgeführt.

### **2.10.2 Statistische Auswertung der $\Delta$ Kontraktion/min in NRKMs**

Alle Daten aus dem Bioassay mit NRKMs wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM in Säulendiagrammen dargestellt. Die statistische Analyse der Daten wurde mit dem Programm GraphPad Prism 5.0d durchgeführt. Zunächst erfolgte eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) der Daten und anschließend ein Posthoc Test nach Tukey-Kamer.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angenommen.

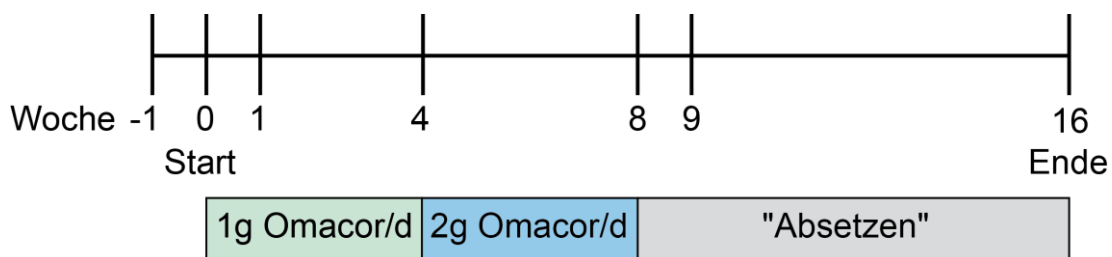
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von omega-3 Fettsäuren auf das endogene CYP-Eicosanoidprofil

Vorangegangene Arbeiten der Arbeitsgruppe zu einer Fütterungsstudie mit Ratten hatten gezeigt, dass die CYP-Eicosanoidbildung *in vivo* von der Verfügbarkeit der Vorläuferfettsäuren abhängt. Da noch wenig über die endogene CYP-Eicosanoidbildung beim Menschen bekannt ist, wurde als zweite Überprüfung des Konzepts eine klinische Studie durchgeführt. In der hier vorgestellten Studie erfolgte eine Nahrungsergänzung mit n-3 PUFA durch die Gabe von Omacor® (im Folgenden auch EPA/DHA-Supplementation genannt). Die Ergebnisse zeigen, dass die Omacor®-Gabe auch im Menschen zu einer Verschiebung des CYP-Eicosanoidprofils von den AA- hin zu den EPA- und DHA-abgeleiteten Metaboliten führte, Abschnitt 3.1.3. Als prominente Epoxymetabolite der n-3 PUFA wurden 17,18-EEQ und 19,20-EDP identifiziert. Die Ergebnisse zeigen weiterhin nicht nur, dass EPA und DHA *in vivo* alternative Substrate für die CYP-Enzyme darstellen, sondern auch dass sie mit AA um den Umsatz zu endogenen Metaboliten konkurrieren und z.T. effektiver umgesetzt werden.

##### 3.1.1 Basale Charakterisierung der Probanden

In der klinischen Studie erhielten 20 freiwillige Teilnehmer (10 Männer und 10 Frauen) für vier Wochen eine Kapsel Omacor®/Tag (480 mg EPA und 360 mg DHA) und für vier weitere Wochen zwei Kapseln Omacor®/Tag. Anschließend wurde das Medikament abgesetzt und die Probanden für weitere acht Wochen beobachtet. Eine Woche vor Studienbeginn und zu allen in Abbildung 10 gezeigten Zeitpunkten, wurden Blut- und Urinproben gewonnen und Fettsäuren mittels Gaschromatographie und CYP-abhängige Metabolite mittels LC-MS/MS bestimmt.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des Studiendesigns.**

In die Studie wurden nur gesunde Teilnehmer mit eingeschlossen. Das mittlere Alter der Probanden lag bei  $31 \pm 8$  (Männer) bzw. bei  $38 \pm 6$  (Frauen) Jahren und deren



BMI bei  $24,9 \pm 2,7 \text{ kg/m}^2$  (Männer) bzw.  $25,5 \pm 3,8 \text{ kg/m}^2$  (Frauen). Weitere basale Charakteristika sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tabelle 10: Basale Charakterisierung der Probanden.**

Klinischer Parameter	Supplementation		
	Basal	2g OM-3	Absetzen
	(W0)	(W8)	(W16)
	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM
<b>Alter [Jahre]</b>			
männlich	$31.3 \pm 2.5$		
weiblich	$38.0 \pm 1.8$		
<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</b>			
männlich	$24.9 \pm 1.0$	$24.9 \pm 1.0$	$24.9 \pm 1.0$
weiblich	$25.5 \pm 1.3$	$25.5 \pm 1.3$	$25.5 \pm 1.3$
<b>Herzfrequenz [bpm]</b>	$64.4 \pm 2.1$	$67.4 \pm 2.1$	$67.9 \pm 2.1$
<b>Systolischer BD [mmHg]</b>	$123.2 \pm 2.9$	$121.3 \pm 2.9$	$121.2 \pm 2.9$
<b>Diastolischer BD [mmHg]</b>	$75.5 \pm 1.7$	$72.0 \pm 1.7$	$73.4 \pm 1.7$
<b>Totales Cholesterin [mmol/L]</b>	$5.2 \pm 0.2$	$5.6 \pm 0.2$	$5.2 \pm 0.2$
<b>LDL [mmol/L]</b>	$3.1 \pm 0.2$	$3.4 \pm 0.2$	$3.2 \pm 0.2$
<b>HDL [mmol/L]</b>	$1.4 \pm 0.1$	$1.5 \pm 0.1$	$1.4 \pm 0.1$
<b>Triglyzeride [mmol/L]</b>	$1.5 \pm 0.2$	$1.1 \pm 0.2$	$1.2 \pm 0.2$

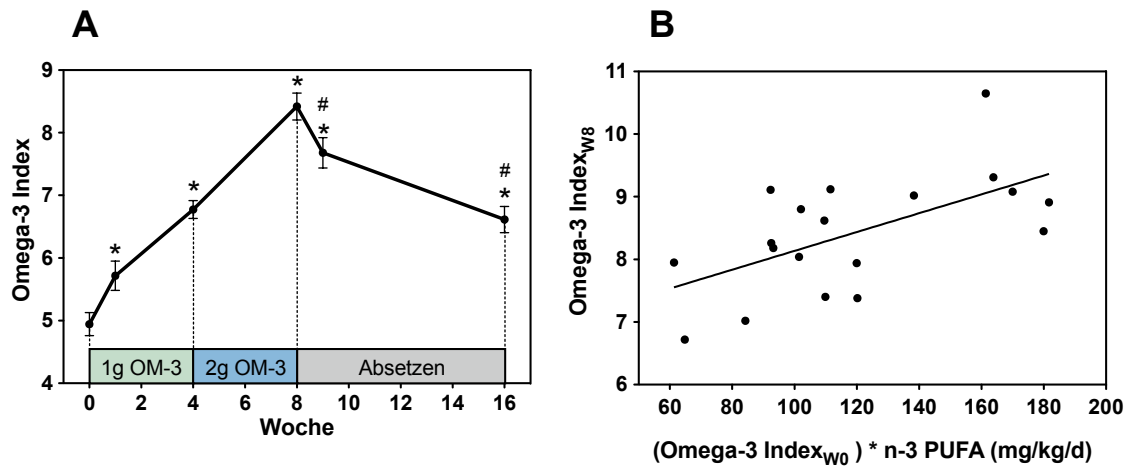
Legende: MW = Mittelwert, SEM = Standardfehler, BMI = body mass index, BP = Blutdruck, LDL = low-density lipoprotein, HDL = high-density lipoprotein

### 3.1.2 Veränderung der endogenen Fettsäurezusammensetzung nach Omacor®- Gabe

Der Omega-3 Index, der sich aus der Summe von EPA und DHA als prozentualer Anteil an den Gesamtfettsäuren in Erythrozyten berechnet, gilt als Maß für die Aufnahme von n-3 PUFA's und spiegelt die langfristige Einlagerung der PUFA's in verschiedenen Geweben/Organen wider (vgl. Einleitung 1.1). Ein Proband (Omeicos26, männlich) reagierte nach Omacor®-Gabe nicht wie alle anderen Probanden mit einem Anstieg des Omega-3 Index. Aus diesem Grund wurde der Proband für diese und alle folgenden Analysen ausgeschlossen.

In die Studie wurden nach einer Voruntersuchung nur Teilnehmer mit einem basalen Omega-3 Index  $< 6$  eingeschlossen. Demzufolge lag der Omega-3 Index vor Behandlung bei  $4,9 \pm 0,2$ . Die Gabe von 1 g Omacor®/Tag führte bereits nach vier Wochen zu einem signifikanten Anstieg des Omega-3 Index, ohne dass ein Aufnahmeplateau erreicht wurde (Abbildung 11 A). Nach anschließender

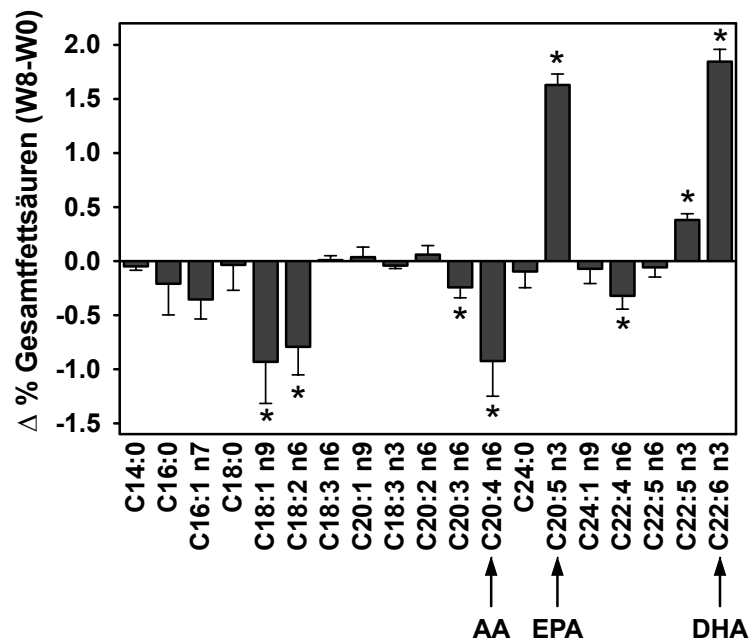
vierwöchiger Behandlung mit 2 g Omacor®/Tag stieg der Omega-3 Index weiter auf  $8,4 \pm 0,2$  an. Zu diesem Zeitpunkt der Studie zeigte sich tendenziell ein Geschlechterunterschied ( $p = 0,085$ ). Bei Frauen stieg der Omega-3 Index höher an ( $8,8 \pm 0,3$ ) als bei Männern ( $8,0 \pm 0,3$ ). Nach Absetzen der Medikation sank der Omega-3 Index zwar wieder ab, jedoch blieb er zum Basalwert signifikant erhöht ( $6,6 \pm 0,2$ ). Abbildung 11 B zeigt die Abhängigkeit der eingenommenen Dosis vom Erreichen der Omega-3 Index-Werte.



**Abbildung 11: Veränderung des Omega-3 Index und individuelle Dosiswirkungen auf den Omega-3 Index nach Omacor®-Gabe.**

Die Abbildung zeigt den gemittelten Omega-3 Index der Probanden über den Verlauf der Studie (A) und die Dosisabhängigkeit des Anstiegs im Omega-3 Index (B). Der nach acht Wochen erreichte Omega-3 Index der Probanden korrelierte positiv mit dem basalen Omega-3 Index und der eingenommenen Dosis ( $r = 0,599$ ,  $p = 0,007$ , Korrelation nach Pearson). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt dargestellt: \* zu Basal (W0) und # zu 8 Wochen Einnahme (W8);  $n=19$  pro Gruppe.

Bei Betrachtung der einzelnen Fettsäuren fiel auf, dass die n-3 PUFAs EPA und DHA nach acht Wochen Omacor®-Gabe signifikant anstiegen, während die entsprechende n-6 PUFA AA signifikant reduziert war, Abbildung 12.



**Abbildung 12: Veränderung im Fettsäureprofil.**

Dargestellt sind Werte aus einer Messung in Erythrozyten nach acht Wochen Omacor®-Gabe im Vergleich zum basalen Fettsäureprofil als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt dargestellt: \* zu Basal (W0);  $n = 19$  pro Gruppe.

Eine genaue Analyse der Fettsäuren ergab, dass AA über den gesamten Studienverlauf die dominierende langkettige PUFA blieb, Tabelle 11. Trotzdem sank der AA-Gehalt nach Omacor®-Gabe geringfügig aber signifikant ab: Basal  $16,8 \pm 0,3$ , 2g OM-3  $15,8 \pm 0,3$  und Absetzen  $14,6 \pm 0,9$ . Die Konzentration von EPA (Basal  $0,7 \pm 0,04$ ) und DHA (Basal  $4,3 \pm 0,2$ ) hingegen stieg mit Omacor®-Gabe signifikant an (2g OM-3  $2,3 \pm 0,1$  bzw.  $6,0 \pm 0,2$ ) und verblieb auch nach Absetzen der Medikation signifikant höher als zu Studienbeginn (Absetzen  $1,1 \pm 0,1$  bzw.  $5,6 \pm 0,2$ ).

Als weitere langkettige PUFA wurde Docosapentaensäure (C22:5 n-6; DPA) untersucht, die als n-6 und als n-3 PUFA auftreten kann. Der Gehalt an n-6 DPA sank nach Omacor®-Gabe nur geringfügig ab und war erst nach Absetzen der Medikation signifikant unterschiedlich zur Ausgangskonzentration, Tabelle 11. Im Gegensatz zur DPA n-6 stieg die DPA n-3 Konzentration mit Omacor®-Gabe an und verblieb auch nach Absetzen der Medikation signifikant erhöht.

**Tabelle 11: Effekt der Omacor®-Gabe auf die Fettsäurezusammensetzung aller Studienteilnehmer.**

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (Gewichtsprozent und Gesamtfettsäuren) vor Studienbeginn (Basal), während der maximalen Einnahme von Omacor® (2 g OM-3) und 8 Wochen nach Absetzen der Medikation (Absetzen), n=19 pro Gruppe. p-Werte < 0,05 waren statistisch signifikant. Hervorgehoben sind AA (C20:4 n-6), EPA (C20:5 n-3) und DHA (C22:6 n-3).

	Basal (W0)		2g OM-3 (W8)			Absetzen (W16)			
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	p (vs W0)	Mittelwert	SEM	p (vs W0)	p (vs W8)
C14:0	0,43	0,03	0,38	0,03	ns	0,37	0,04	ns	ns
C16:0	20,97	0,23	20,77	0,31	ns	21,38	0,25	ns	ns
C16:1 n-7	0,67	0,16	0,32	0,04	ns	0,47	0,06	ns	ns
C18:0	15,18	0,30	15,15	0,25	ns	15,29	0,33	ns	ns
C18:1 n-9	15,70	0,27	14,77	0,39	= 0.048	15,71	0,18	ns	ns
C18:2 n-6	12,74	0,45	11,95	0,44	= 0.007	12,61	0,39	ns	ns
C18:3 n-6	0,10	0,02	0,11	0,04	ns	0,11	0,01	ns	ns
C20:1 n-9	0,20	0,01	0,24	0,09	ns	0,20	0,01	ns	ns
C18:3 n-3	0,21	0,02	0,17	0,02	ns	0,18	0,02	ns	ns
C20:2 n-6	0,22	0,01	0,28	0,08	ns	0,22	0,01	ns	ns
C20:3 n-6	1,76	0,08	1,52	0,12	ns	1,77	0,09	ns	ns
C20:4 n-6	16,88	0,30	15,96	0,25	= 0.038	15,65	0,29	= 0.012	ns
C24:0	1,28	0,09	1,19	0,10	ns	1,40	0,10	ns	ns
C20:5 n-3	0,69	0,04	2,32	0,11	< 0.001	1,06	0,06	< 0.001	< 0.001
C24:1 n-9	1,45	0,10	1,38	0,08	ns	1,40	0,05	ns	ns
C22:4 n-6	3,00	0,10	2,68	0,11	= 0.038	2,47	0,10	< 0.001	ns
C22:5 n-6	0,69	0,04	0,64	0,09	ns	0,56	0,04	= 0.006	ns
C22:5 n-3	2,65	0,09	3,04	0,07	< 0.001	2,84	0,07	= 0.015	= 0.020
C22:6 n-3	4,25	0,18	6,10	0,18	< 0.001	5,56	0,18	< 0.001	< 0.001

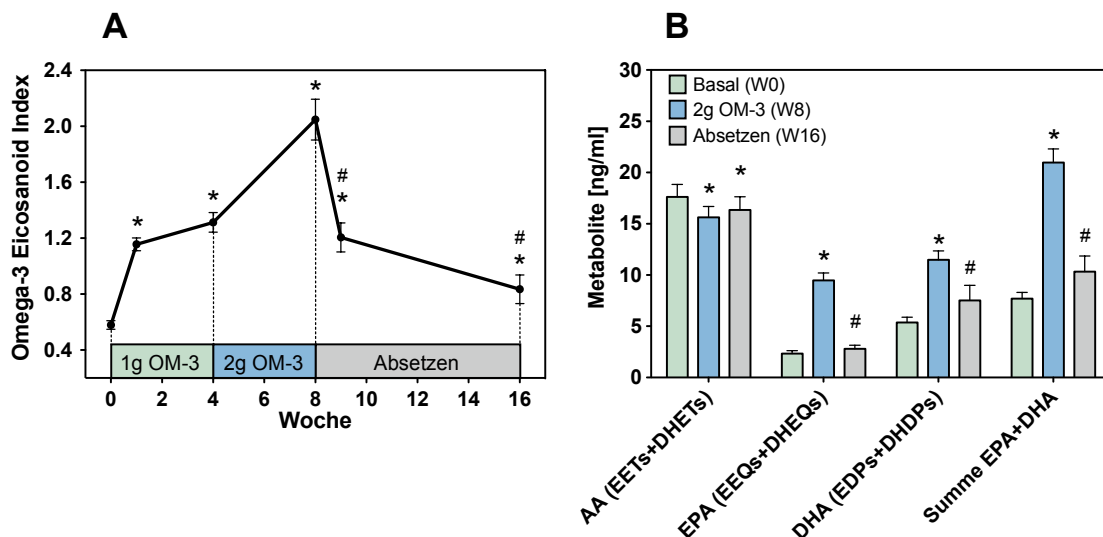
### 3.1.3 Veränderung des endogenen CYP-Eicosanoidprofils nach Omacor®-Gabe

Zur Bewertung einer Verschiebung des CYP-Eicosanoidprofils wurde in der vorliegenden Arbeit der sogenannte CYP-Eicosanoidindex eingeführt. Dieser Index stellt das Verhältnis zwischen der Summe aller gebildeten EPA- und DHA-Metabolite zu den AA-Metaboliten dar. Als Metabolite wurden dabei alle regioisomeren Epoxide und ihre korrespondierenden Diole für die Berechnung mit einbezogen:

$$\text{CYP-Eicosanoidindex} = ((\text{EEQs} + \text{DHEQs}) + (\text{EDPs} + \text{DHDPs})) / (\text{EETs} + \text{DHETs})$$

Die Bestimmung des CYP-Eicosanoidindex erfolgte in Plasmaproben. Zu Studienbeginn dominierten die AA-abgeleiteten Metabolite und der CYP-Eicosanoidindex aller Studienteilnehmer lag bei  $0,6 \pm 0,03$ . Die Gabe von 1 g Omacor®/Tag führte bereits nach einer Woche zu einer annähernden Verdopplung

des CYP-Eicosanoidindex, der bis zu vier Wochen noch geringfügig weiter anstieg ( $1,3 \pm 0,1$ ), Abbildung 13 A. Nach anschließender vierwöchigen Behandlung mit 2 g Omacor®/Tag kam es zu einem nochmaligen Anstieg des CYP-Eicosanoidindex auf  $2,1 \pm 0,2$ . Nach Absetzen der Medikation sank der CYP-Eicosanoidindex ab, blieb aber im Vergleich zum Studienbeginn leicht erhöht ( $0,8 \pm 0,1$ ).



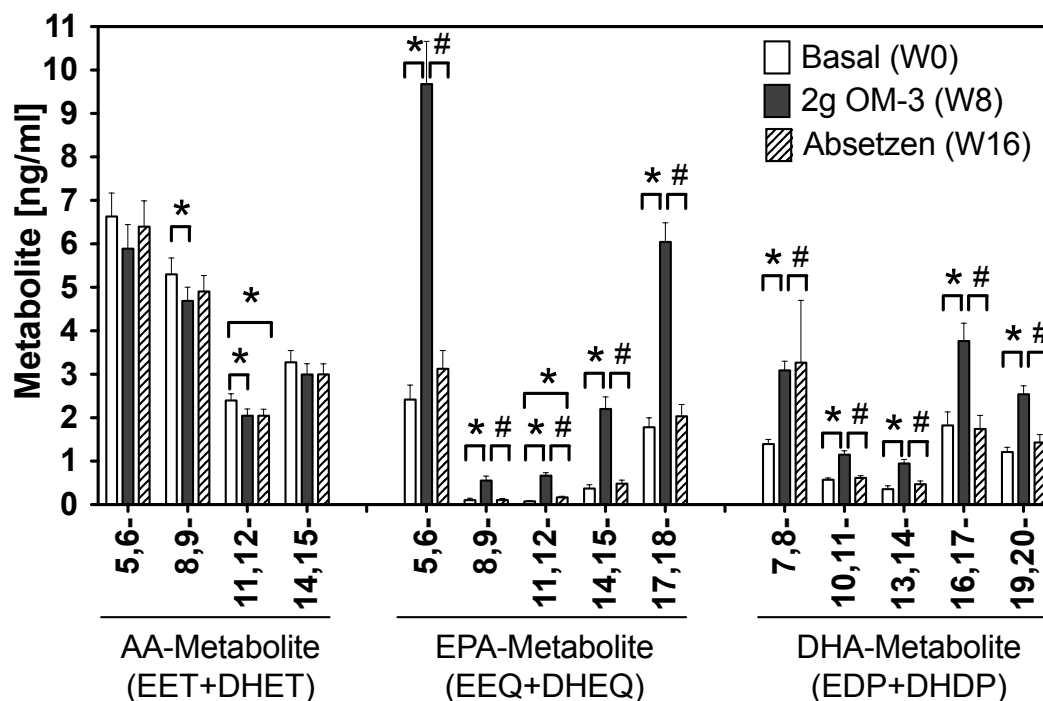
**Abbildung 13: Einfluss der Omacor®-Gabe auf den CYP-Eicosanoidindex (A) und die Plasmakonzentration AA-, EPA- und DHA-abgeleiteter CYP-Eicosanoide (B).**

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt dargestellt: \* zu Basal (W0) und # zu 2g OM-3 (W8);  $n=19$  pro Gruppe.

Die oben dargestellten Effekte der Omacor®-Gabe auf den CYP-Eicosanoidindex beruhen v.a. auf einem starken Anstieg der EPA- und DHA-abgeleiteten Metabolite, Abbildung 13 B. So führte die Omacor®-Gabe zu einem geringfügigen aber signifikanten Abfall der AA-Metabolite (von  $17,4 \pm 1,2$  ng/ml vor Studienbeginn auf  $15,4 \pm 1,0$  ng/ml nach acht Wochen Behandlung). Parallel stiegen die Plasmakonzentrationen der EPA-Metabolite um nahezu das Vierfache (von  $2,5 \pm 0,3$  ng/ml auf  $9,6 \pm 0,7$  ng/ml) und die der DHA-Metabolite um das Zweifache an (von  $5,4 \pm 0,5$  ng/ml auf  $11,3 \pm 0,9$  ng/ml). Nach achtwöchiger Omacor®-Gabe überstieg die Gesamtkonzentration der (EPA+DHA)-Metabolite ( $20,8 \pm 1,6$  ng/ml) sogar die Konzentration der AA-Metabolite. Nach Absetzen der Medikation sank der Gehalt an (EPA+DHA)-Metaboliten wieder unter das Niveau der AA-Metabolite, Abbildung 13 B.

Die Regioisomerenzusammensetzung der AA-, EPA- und DHA-abgeleiteten Metabolite ist in Abbildung 14 gezeigt. Die regioisomeren AA-Metabolite traten in ähnlich hohen Konzentrationen mit folgender Reihenfolge auf:

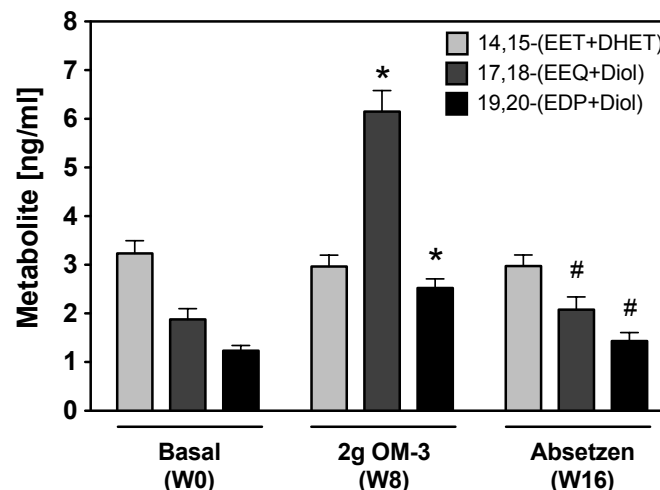
5,6-(EET+DHET)  $\approx$  8,9-(EET+DHET) > 14,15-(EET+DHET) > 11,12-(EET+DHET). Als Hauptprodukte der EPA-Epoxidation waren 5,6-(EEQ+DHEQ) und 17,18-(EEQ+DHEQ) nachweisbar. Unter den DHA-Metaboliten dominierten die 16,17-, 7,8- und 19,20-Regioisomere.



**Abbildung 14: Effekt der Omacor®-Gabe auf die Bildung der von AA-, EPA- und DHA-abgeleiteten regioisomeren Epoxymetaboliten.**

Zusammenstellung verschiedener regioisomerer Epoxymetabolite, die aus dem CYP-abhängigen Umsatz von AA, EPA und DHA entstanden sind. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt dargestellt: \* zu Basal (W0) und # zu 2g OM-3 (W8);  $n=19$  pro Gruppe.

Bei vergleichender Betrachtung der Metabolite, die durch CYP-abhängige Epoxidation der jeweiligen endständigen Doppelbindung entstehen, wurde die Verschiebung des Metabolitenprofils durch Omacor®-Gabe besonders deutlich, Abbildung 15. Nach maximaler Behandlung mit Omacor® überstieg die Plasmakonzentration von 17,18-(EEQ+DEHQ) ( $6,2 \pm 0,4$  ng/ml 2 g OM-3) den Gehalt an 14,15-(EET+DHET) ( $3,0 \pm 0,2$  ng/ml 2g OM-3). Die 17,18-(EEQ+DHEQ)-Konzentration, war nach Omacor®-Gabe dreimal so hoch wie vor der Behandlung. 19,20-(EDP+DHDP) wies im Vergleich die geringste Ausgangskonzentration auf ( $1,2 \pm 0,1$  ng/ml Basal), stieg aber mit Omacor®-Gabe signifikant an ( $2,5 \pm 0,2$  ng/ml 2g OM-3). Nach Absetzen der Medikation wurden für 17,18-(EEQ+DEHQ) und 19,20-(EDP+DHDP) wieder Basalwerte erreicht ( $2,1 \pm 0,3$  ng/ml bzw.  $1,4 \pm 0,2$  ng/ml Absetzen).



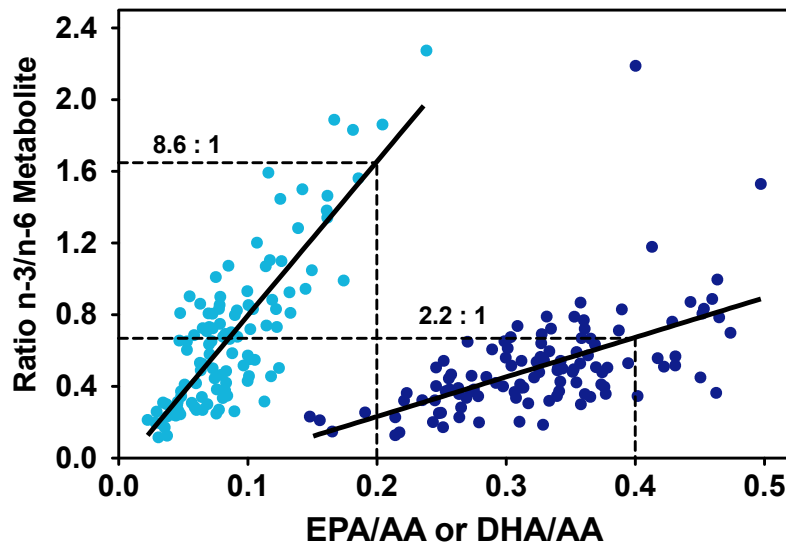
**Abbildung 15: Vergleich ausgewählter regioisomerer Epoxymetabolite.**

Vergleichend sind CYP-abhängige Metabolite aus AA, EPA und DHA gezeigt, deren endständige Doppelbindung epoxidiert ist. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM dar. Die Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt definiert: \* zu Basal (W0) und # zu 2g OM-3 (W8);  $n=19$  pro Gruppe.

Als nächstes wurde untersucht, ob das Verhältnis der Vorläuferfettsäuren EPA/AA dem Verhältnis der CYP-abhängigen Metabolite (EEQs+DHEQs)/(EETs+DHETs) entspricht oder ob abhängig von der Aktivität der CYP-Enzyme eine Verschiebung im Metabolitverhältnis vorliegt. Zu diesem Zweck wurden die Verhältnisse der Vorläuferfettsäuren und der Metabolite miteinander korreliert, Abbildung 16 links. Die Korrelation nach Pearson war statistisch signifikant ( $r=0,826$ ,  $p < 0,001$ ).

Eine vergleichende Analyse mit dem Verhältnis von DHA/AA zeigte ebenfalls eine Korrelation mit dem Verhältnis der entsprechenden Metabolite (EDPs+DHDPs)/(EETs+DHETs; Korrelation nach Pearson:  $r=0,587$   $p < 0,001$ ), Abbildung 16 rechts.

Der Anstieg der Korrelationsgeraden dient als Maß für die relative Effizienz des Umsatzes von Vorläuferfettsäure zu den Metaboliten und deutet bei den erhobenen Daten darauf hin, dass EPA  $\sim 8,6$  mal ( $y=8,60x - 0,06$ ) und DHA  $\sim 2,2$  mal ( $y=2,21x - 0,21$ ) effizienter als AA zu den entsprechenden CYP-Eicosanoiden umgesetzt werden, Abbildung 16.

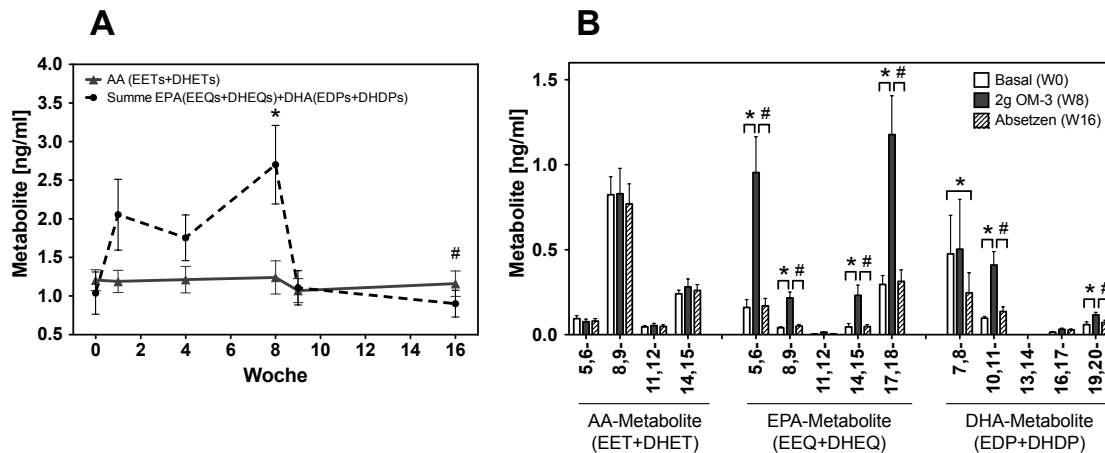


**Abbildung 16: Relative Effizienz im Umsatz der Vorläuferfettsäuren zu Epoxymetaboliten und deren Diolen.**

Aufgetragen ist in das Verhältnis aus den Vorläuferfettsäuren EPA und AA zu den entsprechenden Metaboliten von EPA und AA (links) sowie das Verhältnis aus den Vorläuferfettsäuren DHA und AA zu den entsprechenden Metaboliten von DHA und AA (rechts). Die dargestellten Werte sind Messwerte von allen Probanden (n=19) zu jedem Untersuchungszeitpunkt der Studie.

Veränderungen im CYP-Eicosanoidprofil wurden nach Omacor®-Gabe auch im Urin gemessen. Hier überstieg die Summe aus EPA- und DHA-abgeleiteten Metaboliten ( $2,7 \pm 0,5$  ng/ml) den Gehalt an AA-Metaboliten ( $1,2 \pm 0,2$  ng/ml) nach acht Wochen Omacor®-Gabe. Nach Absetzen der Medikation sank der Gehalt an (EPA+DHA)-Metaboliten ( $0,9 \pm 0,2$  ng/ml) wieder unter den der AA-Metabolite ( $1,2 \pm 0,2$  ng/ml), Abbildung 17 A. Während die AA- und DHA-abgeleiteten verschiedenen Regioisomere nach Omacor®-Gabe weitgehend unverändert blieben, stiegen die verschiedenen EPA-Metabolite, insbesondere 17,18-EEQ, signifikant an. Der Gehalt an 17,18-(EEQ+DHEQ) erhöhte sich mit der Einnahme von Omacor® um knapp das 4-fache (von  $0,3 \pm 0,1$  ng/ml Basal auf  $1,3 \pm 0,2$  ng/ml 2 g OM-3). Nach Absetzen der Medikation wurden wieder Ausgangswerte erreicht ( $0,4 \pm 0,1$  ng/ml).





**Abbildung 17: Einfluss der Omacor®-Gabe auf das CYP-Eicosanoidprofil im Urin.**

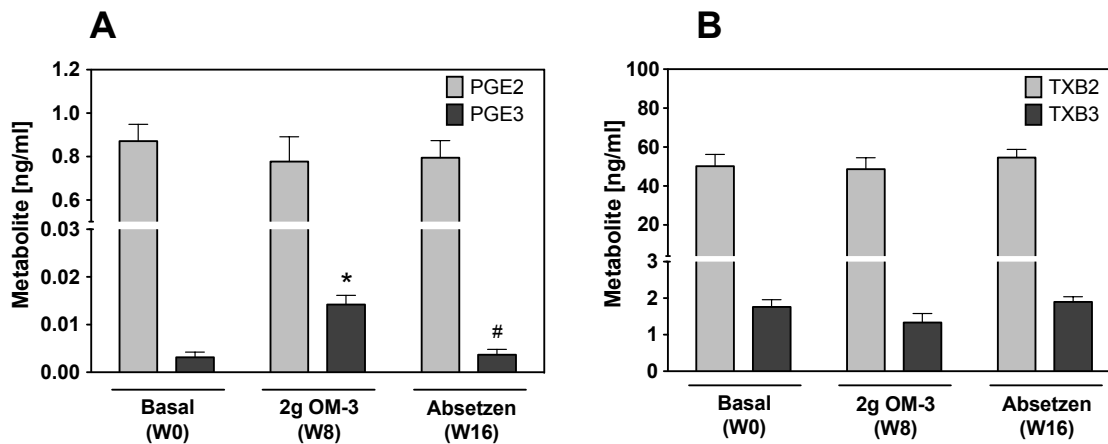
Gehalt an AA- bzw. (EPA+DHA)-abgeleiteten Epoxymetaboliten und deren korrespondierenden Diolen über den Verlauf der Studie (A). Darstellung der verschiedenen Regioisomere und deren Veränderung vor, während und nach der Studie (B). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt dargestellt: \* gegenüber Basal (W0) und # gegenüber 2g OM-3 (W8);  $n=19$  pro Gruppe.

### 3.1.4 Veränderung des endogenen COX- und LOX-Eicosanoidprofils nach Omacor®-Gabe

Neben der Analyse des endogenen CYP-Eicosanoidprofils (Kapitel 3.1.3), wurden auch die Veränderungen im COX- und LOX-abhängigen Eicosanoidprofil untersucht. Ziel war es herauszufinden, ob diese Enzymwege in gleicher Weise wie der CYP-abhängige Weg durch die EPA/DHA-Gabe beeinflusst werden.

Zunächst wurde der Einfluss der EPA/DHA-Supplementation auf das COX-abhängige Eicosanoidprofil untersucht, Abbildung 18. Der von EPA abgeleitete COX-abhängige Metabolit Prostaglandin E3 (PGE3) stieg nach acht Wochen Behandlung geringfügig, aber statistisch signifikant an (Basal  $0,003 \pm 0,001$  ng/ml zu 2 g OM-3  $0,014 \pm 0,002$  ng/ml) und sank nach Absetzen der Medikation wieder ab (Absetzen  $0,004 \pm 0,001$  ng/ml). Der von AA abgeleitete Metabolit PGE2 blieb durch die Behandlung unverändert, war aber der dominierende Metabolit ( $\geq 0,78$  ng/ml), Abbildung 18 A.

Die EPA/DHA-Supplementation hatte keinen Effekt auf die COX-abhängige Metabolisierung von AA und EPA zu entsprechenden Thromboxanen (TXB2 bzw. TXB3). Auch hier trat der AA-abgeleitete Metabolit TXB2 dominierend auf ( $\geq 48,12$  ng/ml TXB2 vs  $\geq 1,33$  ng/ml TXB3), Abbildung 18 B.



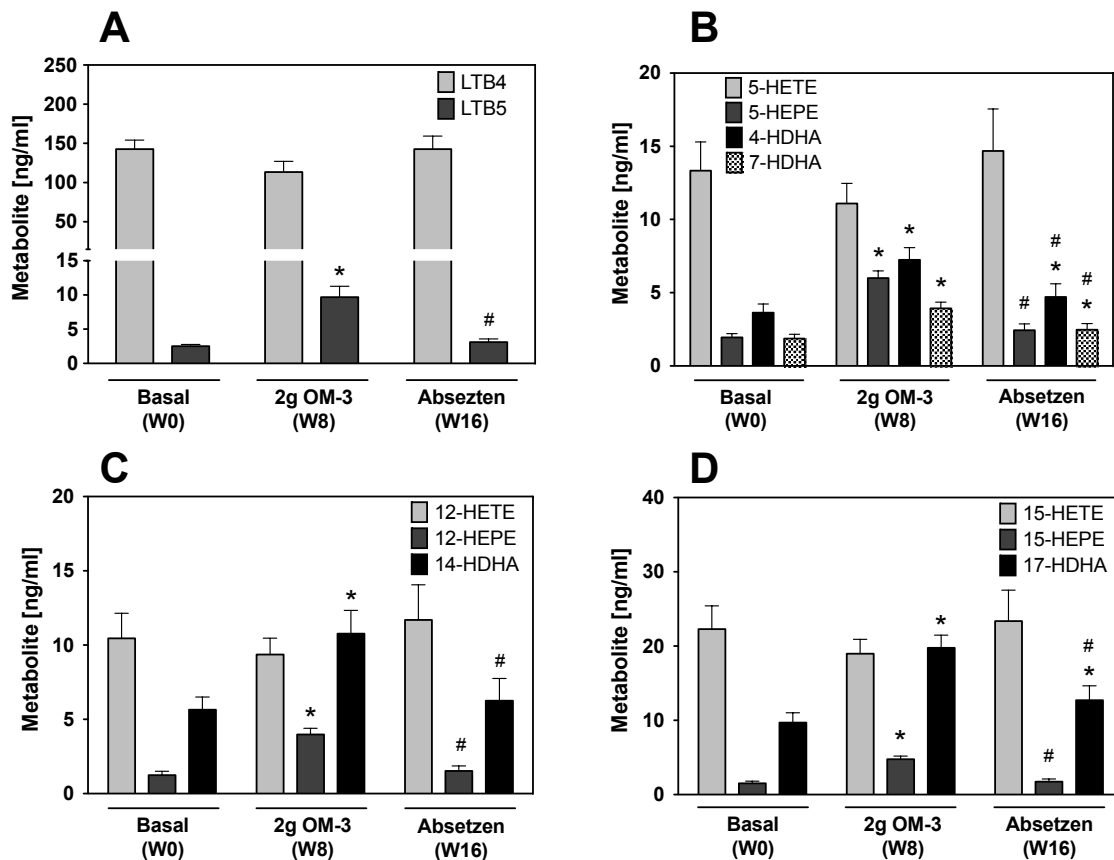
**Abbildung 18: Einfluss der Omacor®-Gabe auf das COX-abhängige Eicosanoidprofil.**

Die hier gezeigte Gehalt an Metaboliten wurde durch Stimulation von Vollblutproben mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor erhalten. Dies gab Auskunft über die Kapazität der Bildung von Metaboliten aus dem Umsatz von AA oder EPA durch entweder COX-Enzyme (A) oder LOX-Enzyme (B). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt dargestellt: \* gegenüber Basal (W0) und # gegenüber 2g OM-3 (W8);  $n=19$  pro Gruppe.

Weiterhin wurde der Effekt der EPA/DHA-Supplementation auf die Bildung LOX-abhängiger Metabolite untersucht, Abbildung 19. Ähnlich dem PGE3 stieg auch Leukotrien B5 (LTB5), das von EPA abgeleitet ist, nach acht Wochen Behandlung geringfügig aber signifikant an (Basal  $2,50 \pm 0,27$  ng/ml zu 2g OM-3  $9,67 \pm 1,61$  ng/ml) und sank nach Absetzen der Medikation wieder ab (Absetzen  $3,10 \pm 0,48$  ng/ml). Der entsprechende von AA-abgeleitete Metabolit LTB4 blieb während der Behandlung unverändert und war in wesentlich größeren Mengen als der EPA-abgeleitete Metabolit LTB5 vorhanden, Abbildung 19 A. LTB4 und LTB5 sind Metabolite, die durch den 5-LOX-Metabolismus aus AA bzw. EPA entstehen, aber auch weitere Metabolite, sogenannte Hydroxymetabolite, können durch den Umsatz von 5-LOX-Enzymen entstehen, Abbildung 19 B. Nach Supplementation stiegen die von EPA- und DHA-abgeleiteten Hydroxymetabolite leicht, aber signifikant an. Die DHA-Metabolite blieben nach Absetzen der Medikation sogar signifikant zu den Basalwerten erhöht. 5-HETE, der AA-abgeleitete 5-LOX-abhängige Metabolit, blieb während der Behandlung unverändert.

Der 12-LOX Weg aus dem von AA 12-HETE, von EPA 12-HEPE und von DHA 14-HDHA hervorgehen, reagierte auf die EPA/DHA-Supplementation mit einem signifikanten Anstieg von sowohl 12-HEPE als auch 14-HDHA, Abbildung 19 C. Nach Absetzen der Medikation sank der Gehalt wieder auf das Ausgangsniveau. Der von AA abgeleitete Hydroxymetabolit 12-HETE hingegen blieb während der Behandlung unverändert. Ähnlich stellt es sich mit dem Umsatz von AA, EPA und DHA durch 15-

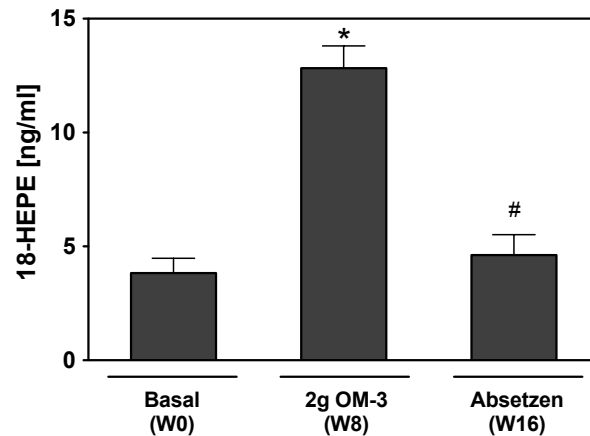
LOX Enzyme dar. Während 15-HEPE und 17-HDHA nach acht Wochen EPA/DHA-Supplementation signifikant anstiegen, blieb 15-HETE unverändert, Abbildung 19 D.



**Abbildung 19: Einfluss der Omacor®-Gabe auf das LOX-abhängige Eicosanoidprofil.**

5-LOX abhängige Metabolite, die von AA (LTB4) oder EPA (LTB5) abgeleitet sind (A). Metabolisierung von AA, EPA und DHA zu entsprechenden Hydroxymetaboliten durch 5-LOX (B), 12-LOX (C) oder 15-LOX (D). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt dargestellt: \* gegenüber Basal (W0) und # gegenüber 2g OM-3 (W8);  $n=19$  pro Gruppe.

18-HEPE ist ein von EPA abgeleiteter Metabolit, der als Vorläufer für anti-inflammatorische und entzündungsauflösenden Mediatoren, sogenannten E-Serie Resolvinen, dienen kann. Die Messung dieses Metaboliten zeigte, dass eine acht wöchige Behandlung der Probanden zu einer signifikanten Erhöhung führte (Basal  $3,83 \pm 0,65$  ng/ml zu 2g OM-3  $12,82 \pm 0,98$  ng/ml), Abbildung 20. Nach Absetzen der Medikation sanken die 18-HEPE-Werte wieder auf die Ausgangswerte (Absetzen  $4,62 \pm 0,90$  ng/ml).

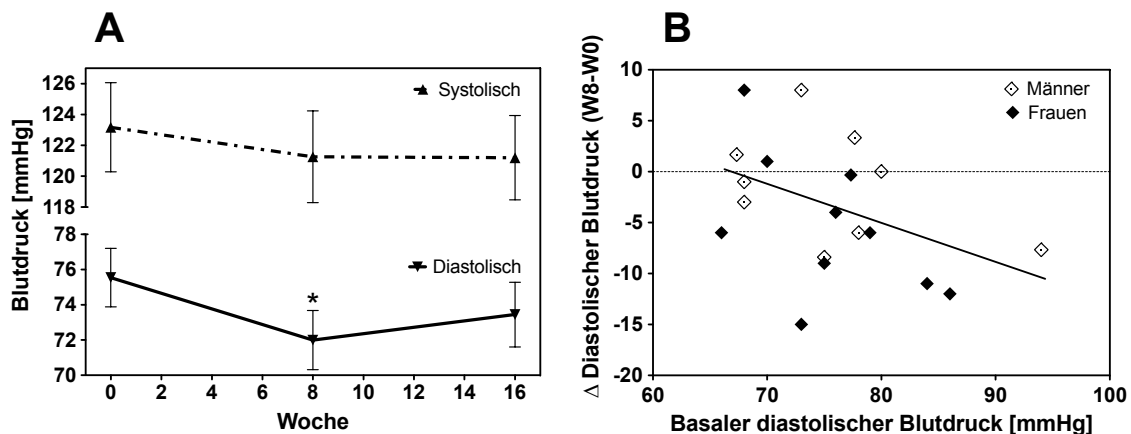


**Abbildung 20: Einfluss der Omacor®-Gabe auf die Bildung von 18-HEPE.**

18-HEPE ist ein von EPA abgeleiteter Metabolit, der als Vorläufer für anti-inflammatorische Metabolite, sogenannten E-Resolvinen, dienen kann. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt dargestellt: \* gegenüber Basal (W0) und # gegenüber 2 g OM-3 (W8);  $n=19$  pro Gruppe.

### 3.1.5 Einfluss der Omacor®-Gabe auf klinische Risikofaktoren

Neben massiven Veränderungen im endogenen CYP-Eicosanoidprofil nach EPA/DHA-Supplementation wurden auch Veränderungen von klinischen Risikofaktoren wie Blutdruck und Plasmatriglyzeride gefunden.



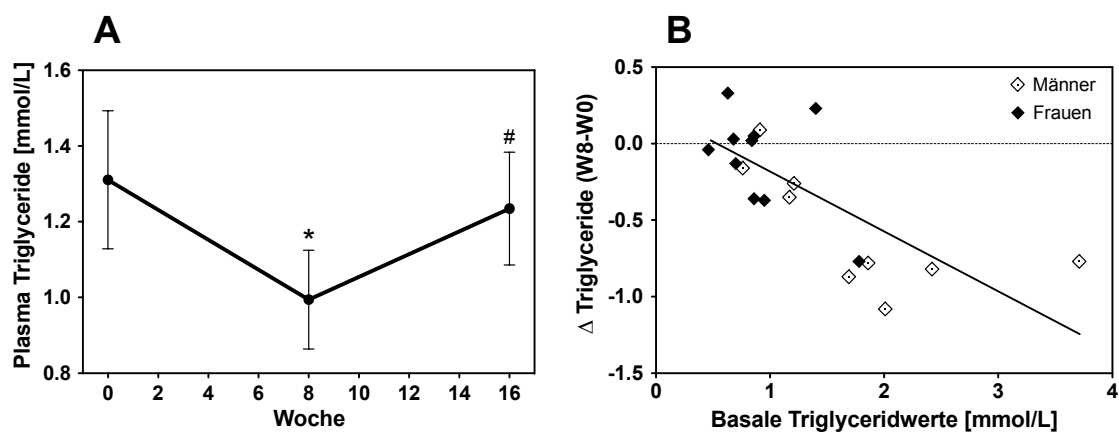
**Abbildung 21: Einfluss der Omacor®-Gabe auf den Blutdruck.**

Veränderungen im systolischen und diastolischen Blutdruck aller Probanden über den Verlauf der Studie (A) und Abhängigkeit der Reduktion des Blutdrucks vom basalen Blutdruck (B). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt dargestellt: \* gegenüber Basal (W0) und # gegenüber 2 g OM-3 (W8);  $n=19$  pro Gruppe.

Bei Betrachtung des Blutdrucks fiel auf, dass sowohl der systolische als auch der diastolische BD nach acht Wochen Behandlung reduziert waren, wobei nur die Reduktion des diastolischen Blutdrucks statistisch signifikant war (Basal  $75,54 \pm 1,66$  mmHg zu 2g OM-3  $72,0 \pm 1,68$  mmHg;  $p=0,036$ ), Abbildung 21 A. Mit

nur einer Ausnahme lag der Blutdruck der Probanden im Normalbereich. Probanden mit einem relativ hohen Blutdruck zeigten nach acht Wochen Behandlung die größte Reduktion im Blutdruck, Abbildung 21 B.

Die Untersuchungen der klinischen Parameter ergaben weiterhin Veränderungen in den Plasmatriglyzeriden der Probanden. Eine achtwöchige Behandlung mit EPA/DHA führte zu einer signifikanten Reduktion der Triglyzeridwerte (Basal  $1,31 \pm 0,18$  mmol/L auf 2 g OM-3  $0,99 \pm 0,13$  mmol/L;  $p=0,004$ ), Abbildung 22 A. Dies war ein Effekt, der reversibel war, da nach Absetzen der Medikation die Triglyzeridwerte wieder anstiegen ( $1,24$  mmol/L). Ähnlich dem Blutdruck wurde bei Probanden mit relativ hohen Triglyzeridwerten die größte Reduktion nach Omacor®-Gabe beobachtet, Abbildung 22 B.



**Abbildung 22: Einfluss der Omacor®-Gabe auf Plasmatriglyzeride.**

Veränderungen der Triglyzeridwerte aller Probanden über den Verlauf der Studie (A). Abhängigkeit einer Reduktion der Triglyzeridwerte von basalen Werten (B). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt dargestellt: \* gegenüber Basal (W0) und # gegenüber 2 g OM-3 (W8);  $n=19$  pro Gruppe.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass mit Gabe von Omacor® sowohl im Plasma als auch im Urin die n-3 PUFA abgeleiteten CYP-Epoxy-metabolite signifikant anstiegen. Besonders trat dabei der EPA-Metabolit 17,18-EEQ hervor. EPA scheint im Vergleich zu AA besonders effektiv zu den entsprechenden CYP-Epoxy-metaboliten umgesetzt zu werden. Im Vergleich dazu spiegelte sich die Aufnahme von n-3 PUFAs nicht so stark in der Bildung COX- bzw. LOX-abhängiger Metabolite wider. Eine Ausnahme stellte dabei das von EPA abgeleitete 18-HEPE dar, welches deutlich unter EPA/DHA-Supplementation anstieg. Zudem ergaben Untersuchungen klinischer Parameter eine Reduktion im Blutdruck und den Plasmatriglyzeriden.

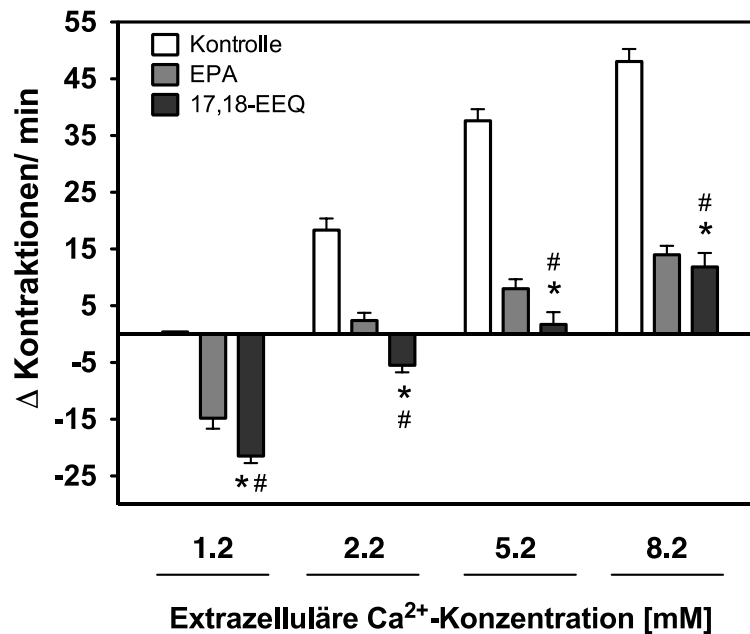
### **3.2 Anti-arrhythmischer Effekt von EPA, dem CYP-abhängigen Epoxymetabolit 17,18-EEQ und synthetischen 17,18-EEQ-Analoga im Zellmodell**

Um den biologischen Effekt von n-3 PUFA's und den davon abgeleiteten CYP-Eicosanoiden zu untersuchen, wurde ein etabliertes Zellmodell gewählt, mit dem die anti-arrhythmische Wirkung von EPA und DHA bereits gezeigt wurde (vgl. Einleitung 1.2.2 und Methoden 2.8). Dazu wurden Kardiomyozyten aus neonatalen Rattenherzen präparierten (NRKMs), die nach 3 - 4 Tagen in Kultur spontan anfangen zu schlagen (vgl. Methoden 2.8). Unter basalen Bedingungen zeigten die Zellen eine Schlagfrequenz von 120 - 150 Kontraktionen pro Minute. Als Messgröße für das Bioassay wurde die Differenz der Schlagfrequenz vor (basal) und nach Zugabe von Substanz herangezogen (chronotroper Effekt). Zunächst wurde die biologische Wirkung von EPA und 17,18-EEQ vergleichend untersucht (Kapitel 3.2.1) und dann eine weiterführende Analyse der Strukturwirkungsbeziehung des 17,18-EEQ auf NRKMs mit Hilfe neu entwickelter synthetischer 17,18-EEQ-Analoga durchgeführt (Kapitel 3.2.2).

Wie im Einzelnen unter Kapitel 3.2.1 beschrieben, zeigte 17,18-EEQ den gleichen biologischen Effekt wie seine Vorläuferfettsäure EPA, wobei 17,18-EEQ schneller und in niedrigerer Konzentration wirkte. Die Untersuchungen zur Strukturwirkungsbeziehung von 17,18-EEQ ergaben (Kapitel 3.2.2), dass strikte strukturelle Voraussetzungen notwendig sind, damit der Epoxymetabolit biologisch wirksam ist.

#### **3.2.1 17,18-EEQ wirkt in gleicher Weise wie die Vorläuferfettsäure EPA auf die Kontraktilität von NRKMs**

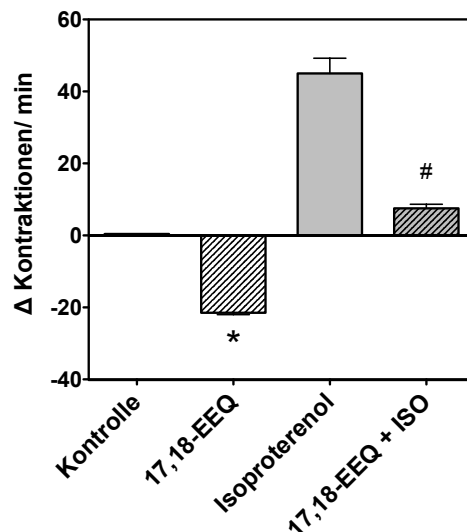
Wie in Abbildung 23 zu sehen, reagierten die Kontroll-NRKMs (weiße Balken) auf die Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit einer Steigerung der Schlagfrequenz. Wurden die Kardiomyozyten hingegen mit EPA vorbehandelt, konnte sowohl unter Basalbedingungen als auch unter steigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen eine Reduktion der Schlagfrequenz gemessen werden (graue Balken). 17,18-EEQ übte in gleicher Weise wie EPA negativ chronotrope Effekte auf NRKMs aus und wirkte dabei sogar signifikant stärker als EPA (dunkelgraue Balken). Während EPA eine längere Inkubationszeit (30 min) und eine höhere Konzentration (3,3  $\mu\text{M}$ ) benötigte, war 17,18-EEQ bereits nach 5 min und bei einer Endkonzentration von 30 nM wirksam.



**Abbildung 23: Biologische Wirkung von EPA und 17,18-EEQ auf NRKMs bei steigender extrazellulärer Kalziumkonzentration.**

17,18-EEQ ( $c_E=30$  nM) wirkt in gleicher Weise wie EPA ( $c_E=3,3$   $\mu$ M) und schützt NRKMs vor einer Überladung mit Kalzium. Die Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM dar. Es wurden mindestens zwei unabhängige NRKMs-Kulturen zur Messung verwendet ( $n=12$ ). \*  $p < 0,05$  zur Kontrolle und # zu EPA.

NRKMs reagierten nicht nur auf eine erhöhte extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration mit einer Erhöhung der Schlagfrequenz (Abbildung 23), sondern auch auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation (1  $\mu$ M Isoproterenol:  $45,0 \pm 4,2$   $\Delta$ Kontraktionen/min). 17,18-EEQ allein zeigte einen negativ chronotropen Effekt ( $-21,5 \pm 0,4$   $\Delta$ Kontraktionen/min) und reduzierte die Antwort der Kardiomyozyten auf Isoproterenol signifikant ( $5,0 \pm 1,0$   $\Delta$ Kontraktionen/ min), Abbildung 24.

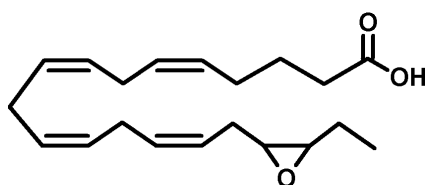


**Abbildung 24: 17,18-EEQ reduziert den Effekt  $\beta$ -adrenerger Stimulation in NRKMs.**

Der positiv chronotrope Effekt nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit 1  $\mu$ M Isoproterenol (ISO) auf spontan-schlagende NRKMs wurde durch Zugabe von 30 nM 17,18-EEQ signifikant vermindert. Die Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM dar. Es wurden mindestens zwei unabhängige NRKMs-Kulturen zur Messung verwendet (n=12). Die Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt dargestellt: \* zur Kontrolle und # zu Isoproterenol.

### 3.2.2 Strukturfunktionsanalyse

Ziele der hier beschriebenen Untersuchungen waren (i) die Identifizierung struktureller Merkmale, die die biologische Wirkung von 17,18-EEQ vermitteln, (ii) die Identifizierung von synthetischen Analoga mit selektiver agonistischer bzw. antagonistischer Funktion für weiterführende mechanistische Untersuchungen und (iii) die Verbesserung der chemischen und metabolischen Stabilität von 17,18-EEQ für eine mögliche *in vivo* Anwendung (Grundstruktur von 17,18-EEQ siehe Abbildung 25).



**Abbildung 25: Struktur des natürlichen EPA-Metaboliten 17,18-EEQ.**

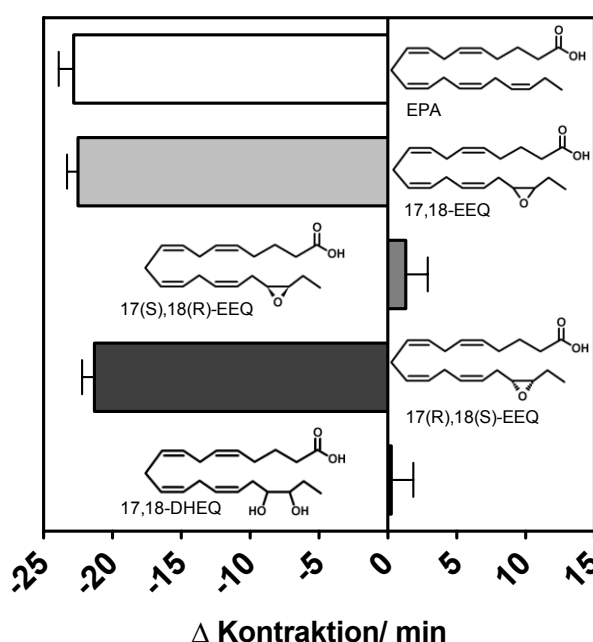
Epoxygenasen, generieren in Abhängigkeit von der Isoform nicht nur eine Reihe von Regioisomeren, sondern auch verschiedene Stereoisomere (vgl. Einleitung 1.3). CYP-abhängig wird EPA bevorzugt an der endständigen Doppelbindung epoxidiert wobei der Epoxymetabolit 17,18-EEQ entsteht. Wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, wurde zunächst die Wirkung der beiden 17,18-EEQ-Stereoisomere (R,S- und S,R-Enantiomer) auf NRKMs getestet.



Doppelbindungen in der 17,18-EEQ-Struktur können Angriffspunkte für COX- und LOX-Enzyme bzw. für eine Autoxidation sein. Zur Identifizierung essentieller Doppelbindungen wurde die Auswirkung der partiellen Sättigung von Doppelbindungen auf den 17,18-EEQ-Effekt untersucht (siehe 3.2.2.2). Ein weiterer Angriffspunkt innerhalb der Struktur des Metaboliten ist die Epoxygruppe in 17,18-Position, Abbildung 25. Zur Identifizierung von Epoxybioisosteren wurde die Epoxygruppe durch eine Harnstoff- oder Oxamidgruppe ersetzt und die Wirkung dieser Strukturanaloga auf NRKMs getestet (siehe Abschnitt 3.2.2.3).

### 3.2.2.1 Stereoselektive 17,18-EEQ-Wirkung auf NRKMs

Das razemische Gemisch von 17,18-EEQ hatte wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben einen negativ chronotropen Effekt auf NRKMs ( $-22,5 \pm 0,8$   $\Delta$ Kontraktionen/min). Dieser Effekt war stereoselektiv, Abbildung 26. Denn, nur das 17(R),18(S)-Enantiomer reduzierte die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten ( $-21,3 \pm 0,9$   $\Delta$ Kontraktionen/min) in gleicher Weise wie das Razemat. Im Gegensatz dazu blieb das 17(S),18(R)-Enantiomer unwirksam ( $1,3 \pm 1,6$   $\Delta$ Kontraktionen/min). 17,18-DHEQ, das sEH-vermittelte Hydrolyseprodukt von 17,18-EEQ, zeigte keinen Effekt auf NRKMs.



**Abbildung 26: Die biologische Aktivität von 17,18-EEQ ist abhängig von der Stereochemie des Metaboliten.**

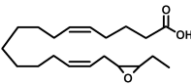
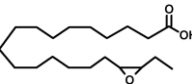
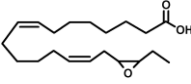
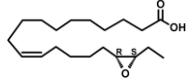
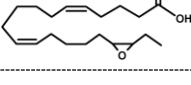
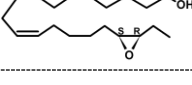
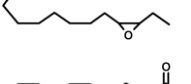
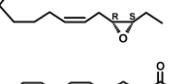
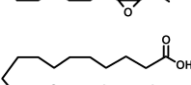
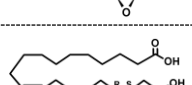
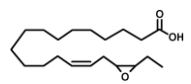
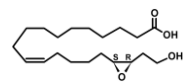
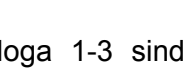
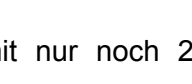
Nur das R,S-Enantiomer zeigte die gleiche biologische Aktivität wie 17,18-EEQ und EPA. Die Hydrolyse der Epoxygruppe führte zu einem Funktionsverlust des Metaboliten. Die Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM dar. Die Substanzen wurden in einer Endkonzentration von 30 nM eingesetzt, außer EPA (3,3  $\mu$ M). Es wurden mindestens zwei unabhängige NRKMs-Kulturen zur Messung verwendet und die Schlagfrequenz jeweils 6 Clustern bestimmt ( $n=12$ ).

### 3.2.2.2 Identifizierung essentieller Doppelbindungen

In enger Zusammenarbeit mit John R. Falck (UT Southwestern) erhielten wir zur Testung auf NRKMs gezielt modifizierte Strukturen von 17,18-EEQ. Eine erste Modifikation der 17,18-EEQ-Struktur beinhaltete die partielle Sättigung von Doppelbindungen. In Tabelle 12 ist die Wirkung dieser synthetischen Analoga auf NRKMs zusammengefasst.

**Tabelle 12 Chronotrope Effekte von 17,18-EEQ Analoga mit partiell gesättigten Doppelbindungen auf NRKMs.**

Analog 3, 6 und 9 stellen modifizierte Strukturen mit einem negativ chronotropen Effekt ähnlich dem endogenen Metaboliten 17,18-EEQ dar. Alle Substanzen wurden in einer Endkonzentration von 30 nM eingesetzt. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

#	Analog	Veränderung (Schläge/min)	n-Zahl	#	Analog	Veränderung (Schläge/min)	n-Zahl
1		$0,0 \pm 1,2$	14	8		$+0,8 \pm 1,6$	14
2		$-2,7 \pm 1,4$	22	9		$-20,3 \pm 1,2$	27
3		$-19,8 \pm 0,8$	28	10		$+3,3 \pm 1,1$	29
4		$-0,6 \pm 1,0$	14	11		$-21,1 \pm 0,8$	18
5		$-0,6 \pm 1,3$	14	12		$+0,7 \pm 0,9$	18
6		$-18,3 \pm 1,5$	21	13		$-4,8 \pm 0,26$	18
7		$-1,2 \pm 1,3$	14	14		$-1,4 \pm 0,34$	18

Analoga 1-3 sind modifizierte Strukturen mit nur noch 2 Doppelbindungen an verschiedenen Positionen, Tabelle 12. Analog 3, welches eine Doppelbindung in 11,12-Position aufwies, zeigte einen negativ chronotropen Effekt ähnlich der endogenen Substanz 17,18-EEQ. Analog 1 und 2 zeigten nur einen schwachen bzw. keinen negativ chronotropen Effekt auf NRKMs. Analoga 4-7 stellen eine Reihe von 17,18-EEQ Strukturanaloga mit nur einer Doppelbindung dar. Auch hier war nur das Analog mit einer 11,12-Doppelbindung wirksam (Analog 6). Die anderen Analoga hingegen zeigten einen schwach negativ chronotropen Effekt. Die vollständige Sättigung der Doppelbindungen führte zu einem unwirksamen 17,18-EEQ-Analog (Analog 8).

Wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, wirkte 17,18-EEQ stereoselektiv. Die Testung der Strukturanaloga 9 und 10 bestätigen diese Enantioselektivität, denn nur das 17(R),18(S)-Enantiomer war wirksam (Analog 9). Analoga 11 und 12 trugen eine Doppelbindung in 14,15-Position statt in 11,12-Position, aber das 17(R),18(S)-Enantiomer war dennoch wirksam (Analog 11). Eine endständige Hydroxylierung ist Teil des Abbauweges von FS und CYP-Eicosanoiden. Strukturen, die zwar eine 11,12-Doppelbindung aufwiesen, aber endständig hydroxyliert waren (Analoga 13 und 14), verloren ihre Aktivität und zeigten nur noch einen schwach negativ chronotropen Effekt auf NRKMs.

### 3.2.2.3 Identifizierung von 17,18-EEQ Strukturen mit stabiler Epoxygruppe:

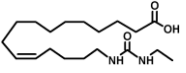
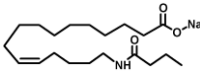
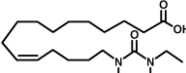
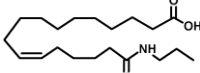
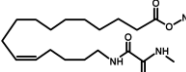
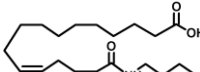
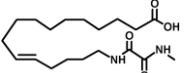
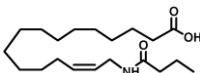
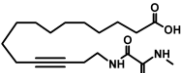
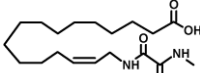
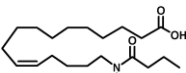
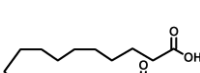
#### *Epoxybioisostere*

Wie in Abbildung 26 zu sehen, führte der Umsatz von 17,18-EEQ mit sEH zu einem unwirksamen Metaboliten, 17,18-DHEQ. *In vivo* spielt die sEH eine zentrale Rolle beim Abbau von Monoepoxiden verschiedener PUFAs. Um robustere und langlebigere Analoga für eine mögliche *in vivo* Anwendung zu erhalten, wurden Strukturanaloga des 17,18-EEQ entwickelt, bei denen die 17,18-Sauerstofffunktion durch eine Harnstoff- oder Oxamidgruppe ersetzt wurde (Epoxybioisostere).

In Tabelle 13 ist die Wirkung verschiedener Epoxybioisostere von 17,18-EEQ auf NRKMs zusammengestellt. Die Substitution der Epoxidgruppe durch eine (NHCO)-Gruppe (Bsp. Analog 15) zeigte die gleiche biologische Aktivität wie der endogene Metabolit 17,18-EEQ. Der negativ chronotrope Effekt fiel sogar etwas stärker aus. Wenn die Harnstoffgruppe allerdings mit Methylgruppen am Stickstoff ergänzt war, war der negativ chronotrope Effekt stark vermindert (Analog 16).

**Tabelle 13: Chronotrope Effekte von Epoxybioisosteren auf NRKMs.**

Unter den Epoxybioisosteren zeigte Analog 17 den stärksten negativ chronotropen Effekt. Alle Substanzen wurden in einer Endkonzentration von 30 nM eingesetzt. Die Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM dar. Es wurden mindestens zwei unabhängige NRKMs-Kulturen zur Messung verwendet ( $n \geq 6$ ).

#	Analog	Veränderung (Schläge/min)	n-Zahl	#	Analog	Veränderung (Schläge/min)	n-Zahl
15		$-27,0 \pm 1,2$	27	21		$-1,6 \pm 0,9$	18
16		$-5,8 \pm 0,4$	6	22		$-4,7 \pm 1,0$	18
17		<b><math>-33,7 \pm 1,3</math></b>	24	23		$-22,4 \pm 1,7$	18
18		$-4,7 \pm 0,45$	18	24		$+12,8 \pm 1,5$	18
19		$-2,6 \pm 0,35$	18	25		$-1,3 \pm 1,0$	18
20		$+0,2 \pm 1,3$	1	26		$+17,8 \pm 1,4$	18

Analysen zu verschiedenen Strukturanaloga mit einer (NHCO)-Gruppe zeigten, dass die Position dieser Gruppe im Molekül entscheidend für die biologische Funktion des Analogs ist (siehe Analoga 20-23).

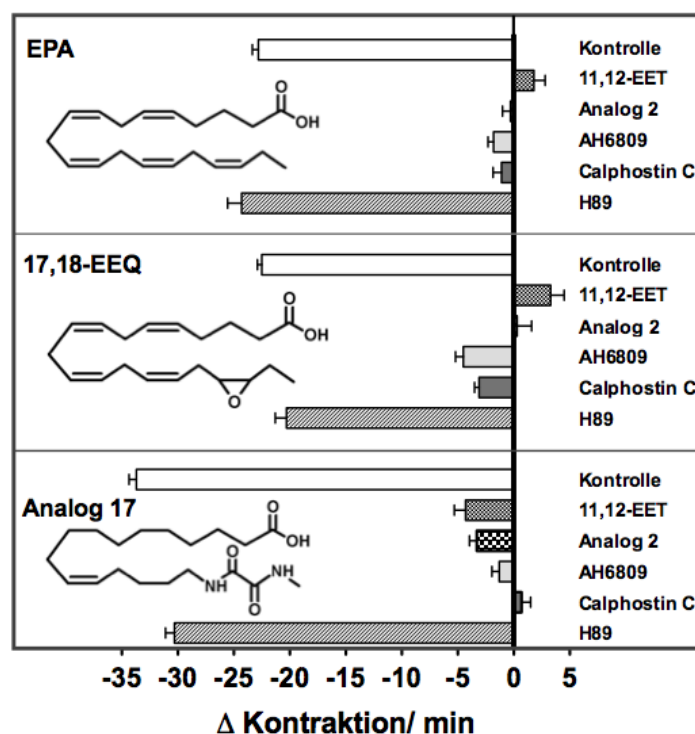
Die Analoga 24, 25 und 26 tragen eine Doppelbindung in 14,15-Position. Unter Betrachtung entsprechender Surrogate (15/26, 17/25, und 21/24) führte die 14,15-Doppelbindung zu einer starken Verminderung oder Aufhebung des negativ chronotropen Effekts.

Eine Substitution der Epoxygruppe an 17,18-Position mit einer Oxamidgruppe reproduzierte den biologischen Effekt des 17,18-EEQ und stellte sich als effektivstes Bioisoster heraus (Analog 17). Die Oxamid-tragenden Verbindungen mit einer trans-Doppelbindung (Analog 18) oder einer Dreifachbindung in 11,12-Position (Analog 19) hingegen zeigten nur eine geringe Aktivität.

### 3.2.3 EPA, 17,18-EEQ und ein synthetischer Agonist aktivieren gleiche Signalwege

Folgender Versuch diente zur Überprüfung, ob EPA, 17,18-EEQ und der am besten wirksame synthetische Agonist (Analog 17) in gleicher Weise zelluläre Signalwege aktivieren.

Wie in Abbildung 27 gezeigt, übte EPA unter Basalbedingungen einen negativ chronotropen Effekt auf NRKMs aus. Sowohl der CYP-abhängige AA-Metabolit 11,12-EET, als auch das synthetische Analog 2 (Antagonist) haben die Reduktion der Schlagfrequenz durch EPA aufgehoben. Nach Zugabe eines PKC-Inhibitors (Calphostin C) und eines unspezifischen Prostanoidrezeptor-Antagonisten (AH6809) wurde der negativ chronotrope Effekt von EPA geblockt. Der PKA-Inhibitor H89 beeinflusste den EPA-Effekt nicht. Das gleiche Inhibitorprofil wurde mit 17,18-EEQ und Analog 17 gezeigt. Analog 17 ( $-33,7 \pm 0,7 \Delta$ Kontraktionen/min) überstieg dabei sogar den negativ chronotropen Effekt von 17,18-EEQ.



**Abbildung 27: EPA, 17,18-EEQ und ein synthetischer Agonist von 17,18-EEQ (Analog 2) verwenden die gleichen Signalwege.**

Die getesteten Substanzen wurden in folgenden Endkonzentrationen verwendet: EPA 3,3  $\mu$ M, 17,18-EEQ, 11,12-EET, Analog2 30 nM, AH6809 10  $\mu$ M, CalphostinC 100 nM und H89 1  $\mu$ M. Die Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM dar. Es wurden mindestens zwei unabhängige NRKMs-Kulturen zur Messung verwendet (n=12).

Die Ergebnisse zeigen, dass der negativ chronotrope Effekt von EPA durch den Epoxymetaboliten 17,18-EEQ vermittelt wird. Dabei wurden stereospezifische Unterschiede in dem Effekt auf NRKMs beobachtet, denn nur das 17(R),18(S)-EEQ war wirksam. Mittels Strukturfunktionsanalyse fanden wir synthetische Analoga, die die gleiche Wirksamkeit wie der endogene Metabolit 17,18-EEQ zeigten. Weiterhin wurde deutlich, dass strikte strukturelle Voraussetzungen gegeben sein müssen, damit 17,18-EEQ wirksam ist. Voraussetzungen waren: (i) die Wirkung der 17,18-

EEQ-Analoga war stereoselektiv, nur das 17(R),18(S)-Enantiomer war wirksam, (ii) eine Doppelbindung in 11,12-Position war für eine agonistische Funktion von Bedeutung und (iii) die Sauerstofffunktion musste in 17,18-Position vorliegen.

Die Vorläuferfettsäure EPA, der CYP-abhängige Epoxymetabolit 17,18-EEQ und der am besten wirksame Agonist (Analog 17) aktivieren gleiche Signalwege, die sich jeweils durch das Struktur analog 2 antagonisieren ließen. Die oben genannten strikten strukturellen Voraussetzungen und die schnelle Wirkung von 17,18-EEQ und den synthetischen Analoga lassen eine spezifische Wechselwirkung mit zellulären Zielstrukturen in den NRKMs vermuten.

### **3.3 Identifizierung eines Rezeptorkandidaten für den 17,18-EEQ-Effekt auf NRKMs**

Neben Ionenkanälen und Transkriptionsfaktoren werden auch Plasmamembranrezeptoren als zelluläre Zielstrukturen für n-3 PUFAs bzw. CYP-Epoxyeicosanoide, angesehen (vgl. Einleitung Kapitel 1.6). Dieses Kapitel der Arbeit diente zur Überprüfung der Hypothese, ob von n-3 PUFAs abgeleitete CYP-Epoxyeicosanoide, im speziellen 17,18-EEQ, über einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus wirken.

Mittels pharmakologischer Intervention mit Pertussistoxin, einem Inhibitor für Gai-Protein gekoppelte Rezeptoren, wurde die Rolle von GPCRs in der Vermittlung des 17,18-EEQ-Effekts auf NRKMs untersucht (Kapitel 3.3.1). Weiterhin wurde ein *orphan* Rezeptor als möglicher Rezeptorkandidat ermittelt (Kapitel 3.3.2), der für anschließende Analysen verwendet wurde. Mittels PCR und Western blot wurde eine Expressionsanalyse des Rezeptorkandidaten in verschiedenen Geweben durchgeführt (Kapitel 3.3.3). Letztlich wurde untersucht, ob der Rezeptor eine funktionale Rolle in der Vermittlung des 17,18-EEQ-Effekts spielt (Kapitel 3.3.4).

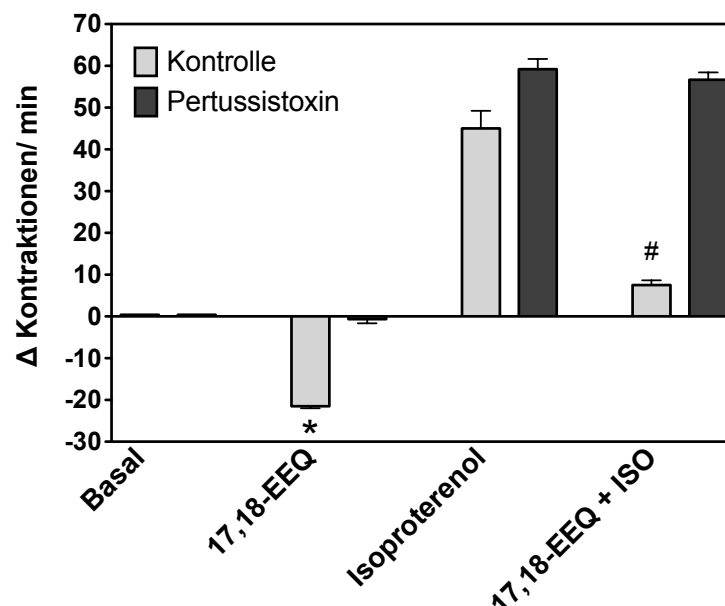
Die Ergebnisse zeigten, dass die spezifische Wechselwirkung von 17,18-EEQ mit NRKMs abhängig von Gai-Proteinen stattfindet. Es wurde ein möglicher Rezeptorkandidat ermittelt, der ebenfalls Gai-Protein gekoppelt ist und speziesübergreifend v.a. im Herzen und Gehirn eine starke Expression zeigte.

#### **3.3.1 Rolle von Gai-Proteinen in der Vermittlung des 17,18-EEQ-Effekts auf NRKMs**

Um eine mögliche Rolle von GPCRs in der Vermittlung des 17,18-EEQ Effekts zu untersuchen, wurden erneut spontan schlagende NRKMs als Testmodell verwendet.

Durch pharmakologische Intervention mit einem Inhibitor von Gai-Proteinen (Pertussistoxin), wurde eine mögliche Rolle von Gai-Protein gekoppelten Rezeptoren untersucht. Dazu wurde die Wirkung von 17,18-EEQ auf unbehandelte Zellen vergleichend mit Pertussistoxin behandelten Zellen untersucht.

Wie in Abbildung 28 zu sehen, zeigte 17,18-EEQ unter Kontrollbedingungen einen negativ chronotropen Effekt ( $-21,5 \pm 0,7 \Delta\text{Kontraktionen/min}$ ). Durch Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  Isoproterenol reagierten die Zellen mit einem deutlichen Anstieg der Schlagfrequenz im Vergleich zu den Basalwerten ( $45,0 \pm 4,3 \Delta\text{Kontraktionen/min}$ ). Dieser Effekt wurde signifikant reduziert wenn die Zellen zusätzlich mit 17,18-EEQ inkubiert wurden ( $7,5 \pm 1,0 \Delta\text{Kontraktionen/min}$ ).



**Abbildung 28: Rolle von Gai-Protein gekoppelten Rezeptoren in der Vermittlung des 17,18-EEQ Effekts.**

Eine Inhibition von Gai-Proteinen mit Pertussistoxin hat den 17,18-EEQ-Effekt aufgehoben. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM dar,  $n=12$ . Die Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) sind wie folgt dargestellt: \* zum Basalwert, # zur Isoprotrenolantwort unter Kontrollbedingungen.

Eine Präinkubation mit Pertussistoxin ( $200 \text{ nM}$  für  $4 \text{ h}$ ) wirkte sich unter Basalbedingungen nicht auf die Zellen aus, jedoch blieb der 17,18-EEQ-Effekt aus ( $-0,7 \pm 1,0 \Delta\text{Kontraktionen/min}$ ). Mit Pertussistoxin vorbehandelte Zellen reagierten auf Isoproterenol mit einem Anstieg der Schlagfrequenz ( $59,2 \pm 2,4 \Delta\text{Kontraktionen/min}$ ). Übereinstimmend mit dem Ausfall des 17,18-EEQ-Effekts unter Basalbedingungen nach Präinkubation mit Pertussistoxin, wurde in Pertussistoxin vorbehandelten NRKMs auch die Fähigkeit des 17,18-EEQ Effekts unterdrückt, die positiv

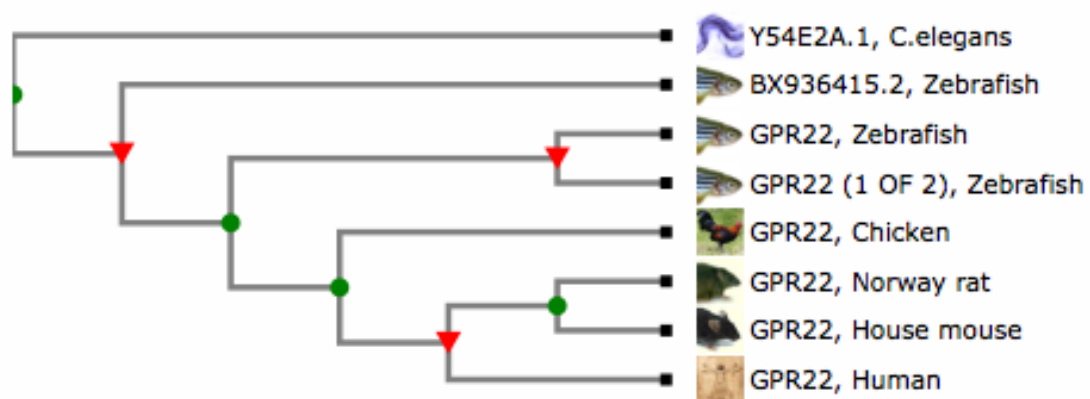
chronotrope Antwort der NRKMs auf Isoproterenol zu inhibieren ( $56,7 \pm 1,8 \Delta$ Kontraktionen/min).

### 3.3.2 Auswahl eines Rezeptorkandidaten

Um einen möglichen Rezeptorkandidaten zu finden, haben wir zunächst aus einer vergleichenden Liste von GPCRs zwischen Maus, Ratte und Mensch die Rezeptoren herausgesucht, die als Lipidrezeptoren beschrieben waren (Liste wurde im Supplement von Gloriam et al., 2006 [182] veröffentlicht). Weiterhin wurden von Gloriam et al. phylogenetische Stammbäume erstellt, anhand derer wir die Verwandtschaftsverhältnisse der *orphan* GPCRs mit den schon bekannten Lipidrezeptoren begutachten konnten. Wir erhielten letztlich eine Liste von 13 möglichen Rezeptorkandidaten, die alle *orphan* GPCRs waren: GPR22, GPR25, GPR26, GPR27, GPR62 (hGPCR8), GPR85, GPR88, GPR120, GPR135, GPR150, GPR153, GPR162, GPR173.

Für weitere Analysen eines möglichen Rezeptorkandidaten für CYP-Eicosanoide haben wir den *orphan* Rezeptor GPR22 ausgewählt. GPR22 erfüllt eine Reihe von Kriterien für einen potentiellen CYP-Eicosanoid-Rezeptor: (i) Phylogenetische Analysen des humanen Genoms zeigten eine Zuordnung von GPR22 zur Rhodopsinfamilie  $\alpha$  der GPCRs [160]. Dies ist eine Unterfamilie, in der schon bekannte Eicosanoidrezeptoren, wie die Prostaglandinrezeptoren (EP1-EP4), zu finden sind. (ii) Neben einer Expression des *orphan* Rezeptors GPR22 im Gehirn [183], wurde v.a. eine Expression des Rezeptors im humanen sowie murinen Herzen nachgewiesen [184, 185]. Innerhalb verschiedener Spezies ist GPR22 hoch konserviert, siehe Abbildung 29. (iii) Über die Funktion von GPR22 ist noch wenig bekannt. Von Adams et al. wurde in einem Mausmodell für Herzhypertrophie beschrieben, dass die GPR22-Expression nach Auslösen einer Drucklast-induzierten Herzhypertrophie (TAC) stark reduziert war und ein KO von GPR22 zu einer erhöhten Empfindlichkeit zu kardialer Dysfunktion nach TAC führte [185]. Dies deutet auf eine physiologische Bedeutung von GPR22 während einer Herzhypertrophie hin.



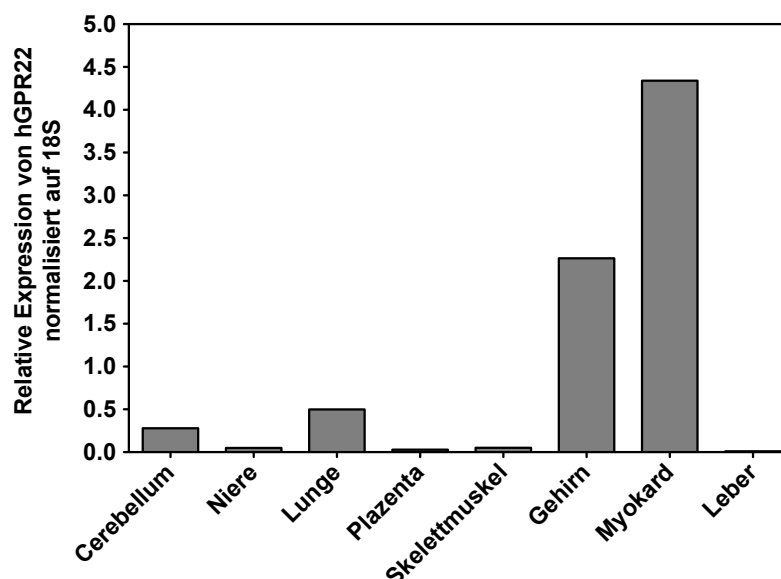


**Abbildung 29: Phylogenetischer Stammbaum des Rezeptorkandidaten GPR22.**

Quelle: <http://www.treefam.org/family/TF318505#tabview=tab1>

### 3.3.3 Expressionsprofil des Rezeptorkandidaten

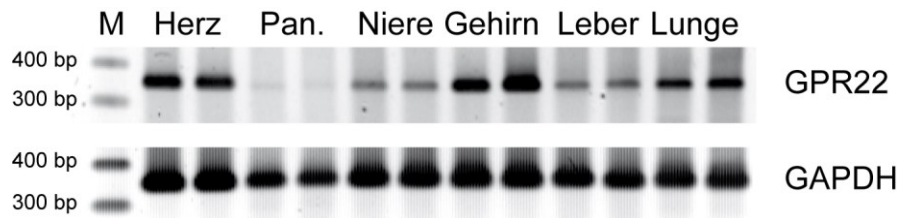
Von dem ausgewählten Rezeptorkandidaten GPR22 wurde zunächst ein Expressionsprofil erstellt. Dazu wurde cDNA verschiedener humaner Gewebe verwendet und mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Analyse der verschiedenen Gewebe hat ergeben, dass GPR22 v.a. in Herzgewebe, Gehirn und in der Lunge exprimiert ist, Abbildung 30. Dies sind Gewebe, die nachweislich von einer n-3 PUFA Gabe profitieren. In der Niere, Plazenta, dem Skelettmuskel und der Leber konnte hingegen nur eine sehr geringe Expression gemessen werden.



**Abbildung 30: Analyse der gewebespezifischen GPR22-Expression mittels qRT-PCR.**

Für die PCR wurden humane cDNA Proben (Clontech) verschiedener Gewebe verwendet und die GPR22-Genexpression in technischen Triplikaten gemessen.

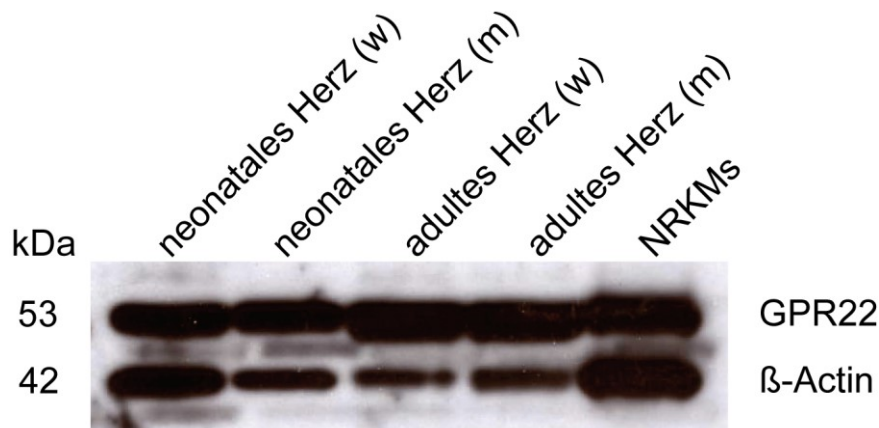
Mittels RT-PCR wurden verschiedene Rattengewebe auf die Expression des Rezeptors hin untersucht. Auch hier lies sich eine erhöhte Expression von GPR22 im Herzen (linken Ventrikel), Gehirn (Cortex) und der Lunge feststellen. In Nierengewebe, der Leber und Pankreas wurde eine geringere Expression beobachtet.



**Abbildung 31: Gewebespezifische Expression von GPR22 in der Ratte.**

Nachweis der GPR22-Rezeptorexpression mittels RT-PCR. Verwendet wurden Gewebeproben von SD-Ratten. Die erwartete Größe des PCR-Produkts für Ratten-GPR22 lag bei 352 bp. Als interne Kontrolle wurde mit den gleichen Gewebeproben eine RT-PCR mit GAPDH-Primern durchgeführt (347 bp). Pan. = Pankreas.

GPR22 war auf Proteinebene sowohl in neonatalen als auch adulten Herzen von SD-Ratten sowie in den Modellzellen unseres Bioassays (NRKMs) nachweisbar, Abbildung 32.



**Abbildung 32: Nachweis der GPR22-Proteinexpression in neonatalen und adulten Rattenherzen sowie in präparierten neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRKMs).**

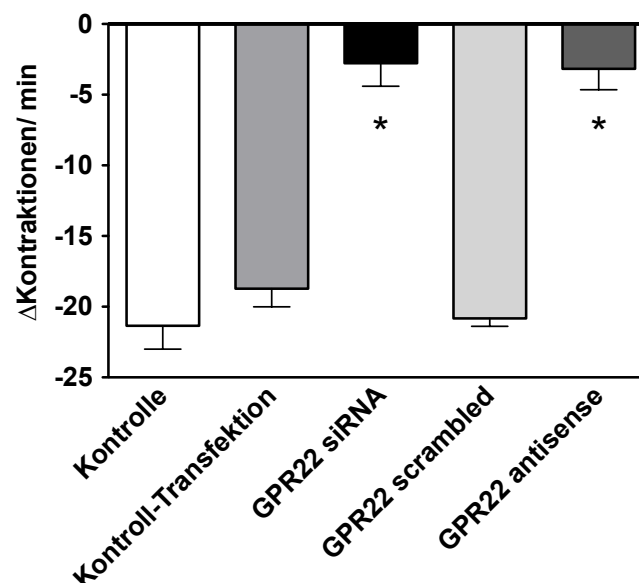
Es wurden je 10 µg Protein für die Western blot Analyse aufgetragen und GPR22 mittels peptidspezifischen polyklonalen Antikörper (CAVK-Antikörper) detektiert. Das theoretische Molekulargewicht von GPR22 liegt bei 53 kDa. Als Referenzprotein wurde  $\beta$ -Actin (42 kDa) verwendet. w = weiblich und m = männlich.

### 3.3.4 GPR22 als Vermittler der Wirkung von 17,18-EEQ

Dieses Kapitel beschreibt die mögliche funktionelle Rolle von GPR22. Dazu wurden NRKMs mit siRNAs oder anti-sense Oligonukleotiden behandelt, die gegen den

Rezeptor gerichtet waren. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit Transfektionsmittel (ohne siRNA) oder mit scrambled Oligonukleotiden inkubiert.

Eine verminderte Expression des Rezeptors mit sowohl siRNA als auch anti-sense Oligonukleotiden führte zu einer signifikanten Reduktion des 17,18-EEQ Effekts (von  $-21,4 \pm 1,5$  auf  $-5,9 \pm 1,6$  bzw.  $-3,3 \pm 1,5$   $\Delta$ Kontraktionen/min;  $p < 0,001$ ); Abbildung 33. Bei Transfektion der Zellen mit Kontrollsubstanzen blieb der negativ chronotrope Effekt von 17,18-EEQ bestehen und im Vergleich zur absoluten Kontrolle unverändert.



**Abbildung 33: 17,18-EEQ-Effekt auf NRKMs ist GPR22-vermittelt.**

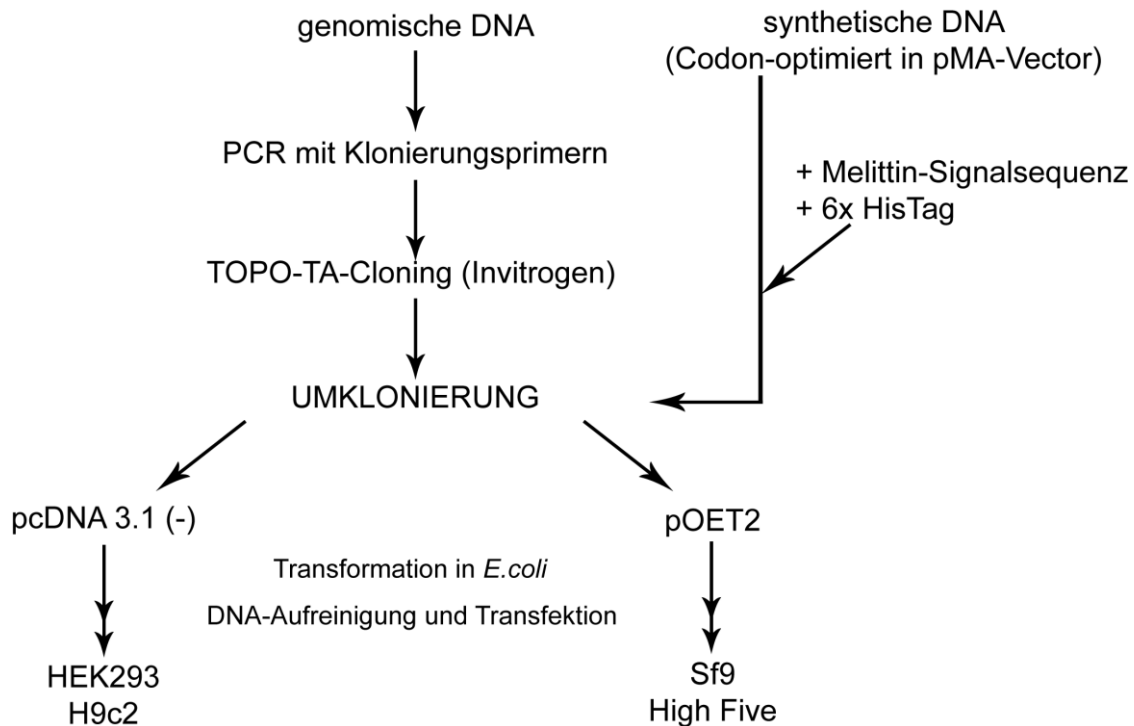
Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM dar,  $n=12$ .) \* zur Kontrolle war signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die Ergebnisse zeigen, dass die 17,18-EEQ-Effekte auf NRKMs über einen Gai-Protein gekoppelten Rezeptor vermittelt werden. Ein möglicher Rezeptorkandidat könnte somit der Gai-Protein gekoppelte *orphan* GPCR GPR22 sein. GPR22 ist v.a. im Herzen und Gehirn exprimiert. Letztlich wurde eine funktionelle Rolle von GPR22 in der Vermittlung des 17,18-EEQ Effekts gezeigt.

### 3.4 Klonierung und Expression des potenziellen Rezeptors in Säuger- und Insektenzellen

Zur Verifizierung der Rezeptorfunktion wurde der Rezeptorkandidat GPR22 sowohl in Säugerzellen als auch in Insektenzellen heterolog exprimiert. Erste Versuche die endogene Sequenz zu exprimieren, führten zu keiner deutlich erhöhten Expression des Rezeptors. Deshalb wurde in einem zweiten Schritt die Sequenz Codon-optimiert

(Kapitel 3.4.1.1) und N-terminal eine Signalsequenz (Kapitel 3.4.1.2) eingefügt. Zusätzlich wurde für verbesserte Detektionsmöglichkeiten C-terminal ein HisTag eingefügt (Kapitel 3.4.1.3). In Abbildung 34 ist ein Ablaufschema der Klonierung dargestellt. GPR22 konnte sowohl in Sf9-Insektenzellen (Kapitel 3.4.2) als auch in HEK293-Säugerzellen (Kapitel 3.4.3) heterolog exprimiert werden.



**Abbildung 34: Ablaufschema zur Klonierung des potentiellen Rezeptorkandidaten.**

### 3.4.1 Klonierung

#### 3.4.1.1 Codon Optimierung

Ein erster Versuch GPR22-cDNA unmodifiziert in Säuger- oder Insektenzellen zu exprimieren war nicht erfolgreich. Um eine verbesserte heterologe Expression zu erreichen, wurde die GPR22 cDNA Codon-optimiert. Codons innerhalb der kodierenden Region wurden dafür mit häufiger verwendeten Codons ausgetauscht (vgl. Methoden 2.3.15).

Ein Vergleich der Originalsequenz des endogenen Rezeptors (GPR22) mit der Codon-optimierten Sequenz (GPRopt) zeigt die Veränderungen, die durch die Codon-Optimierung entstanden sind, siehe Appendix Abbildung 58. Die Veränderungen zeichneten sich v.a. durch den Austausch der dritten Base eines Tripletts aus. Sowohl die Original- als auch die GPRopt-Sequenz kodierten für das gleiche Protein.

### 3.4.1.2 Anfügen der Melittin-Signalsequenz an die Codon-optimierte Rezeptorsequenz

Oft besitzen GPCRs N-terminal eine Signalsequenz, die die Integration des entstehenden Proteins in die ER-Membran unterstützt und dessen Bestimmungsort mit definiert. Untersuchungen der GPR22-Sequenz zur Vorhersage von Signalsequenzen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) haben ergeben, dass der Rezeptor GPR22 eine solche Signalsequenz nicht besitzt. Deshalb wurde zur weiteren Verbesserung der Expression des Rezeptors am 5'-Ende eine abspaltbare Signalsequenz eingefügt. Zu diesem Zweck wurde die Melittin-Signalsequenz (grau markiert) der Honigbiene verwendet.

```

PacI      XhoI      Start Melittin
5' .. TTAATTAACTCGAGAAAATGAAATTCTTAGTCAACGTTGCCCTTGTTTTATGGTCGTAT .. 3'

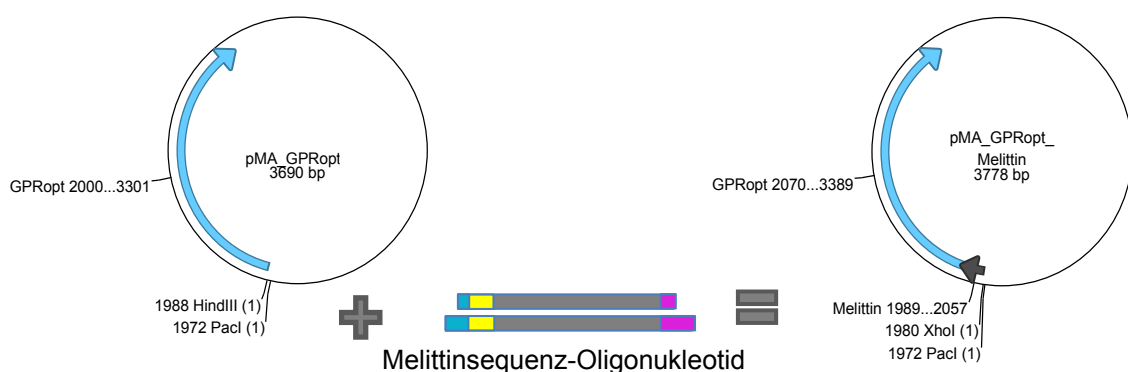
                                     Start GPRopt
5' .. ACATTTCTTACATCTATGCGGCCGCTGAGCTTGCCACCATGTGCTTCAGCCCCATCCTGG .. 3'

```

#### Abbildung 35: Melittinsignalsequenz mit Übergang zur GPRopt-Sequenz.

Das Alignment wurde mit Hilfe von <http://nadv.herokuapp.com/> erstellt.

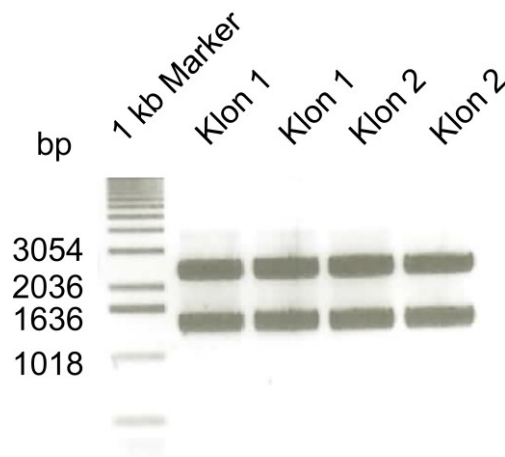
Die Enden des Melittin-enthaltenden Oligonukleotids waren mit entsprechenden Überhängen versehen, um eine Ligation mit dem GPRopt-enthaltenden pMA-Vektor zu ermöglichen. Mit erfolgreichem Einbringen der Signalsequenz wurde die HindIII-Schnittstelle (magenta) zerstört und zusätzlich XhoI (gelb) als neue Restriktionsschnittstelle eingefügt, Klonierungsstrategie siehe Abbildung 36.



**Abbildung 36: Klonierungsstrategie zum Einbringen einer Melittinsignalsequenz in den GPRopt-tragenden pMA-Vektor.**

Zum Einbringen der Melittinsignalsequenz wurde der GPRopt-enthaltende pMA-Vektor mit den Restriktionsenzymen PacI und HindIII geöffnet und mit dem entsprechenden Oligonukleotid ligiert, Abbildung 36. Nach Einbringen der Melittin-Signalsequenz wurde das Plasmid in *E.coli* amplifiziert und mittels CTAB-Methode aufgereinigt.

Zur Überprüfung einer gelungenen Klonierung wurden die neue Spaltstelle XhoI sowie die Restriktionsschnittstelle BamHI für einen Verdau der aufgereinigten Plasmid-Klone (pMA+GPRopt+Melittin) verwendet. Die Fragmente lagen bei 1392 bp und 2368 bp, Abbildung 37. Die endgültige Bestätigung der Richtigkeit der Sequenz wurde über eine Sequenzierung ermittelt und anschließend ausgewählte Klone für weitere Klonierungsschritte verwendet.



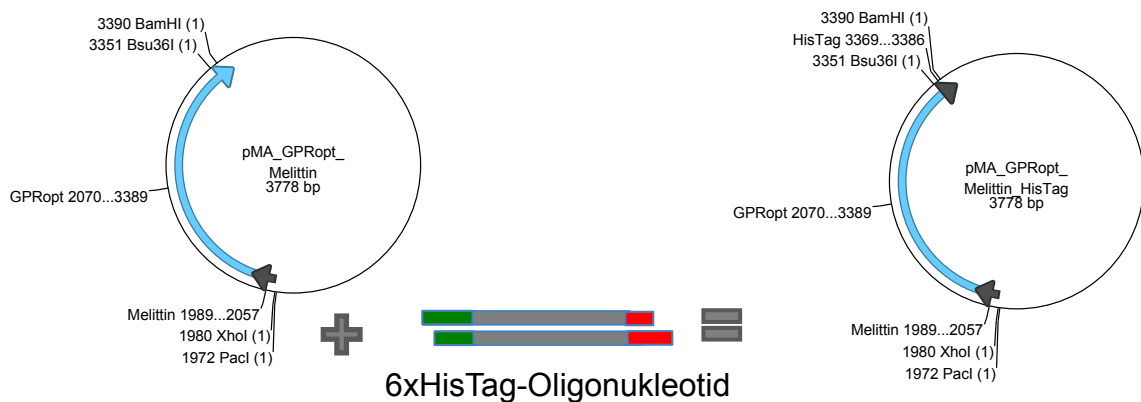
**Abbildung 37: Testspaltung des pMA-Vektors mit GPRopt- und Melittinsequenz**

Die Testspaltung wurde mit BamHI und XhoI nach Klonierung der Melittin-Signalsequenz mit verschiedenen aufgereinigten Plasmidklonen (1 + 2) durchgeführt. Die erwarteten Fragmente nach der Spaltung lagen bei 1392 bp und 2368 bp.

#### 3.4.1.3 Einfügen eines 6x HisTags in die Codon-optimierte Rezeptorsequenz

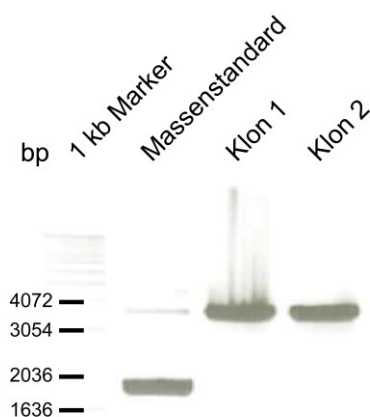
Im Folgenden sollte C-terminal ein 6x HisTag eingefügt werden. Dies diene der besseren Analyse des heterolog exprimierten Proteins im Western blot oder in der Immunfluoreszenz. Folgend ist die Oligonukleotidsequenz zu sehen, die das 6x HisTag trägt (grau). Die Restriktionsorte Bsu36I und BamHI sind grün bzw. rot markiert, siehe auch Abbildung 26.

5' ...TCAGGTGGTGACAGACCATCACCATCATCACTGAG...3'  
 3' ...CCACCACTGTCTGGTAGTGGTAGTAGTAGTACTCCTAG...5'



**Abbildung 38: Klonierungsstrategie zum Einbringen des 6x HisTags in den GPRopt- und Melittinsequenz tragenden pMA-Vektor.**

Zum Einbringen des 6x HisTags in die GPRopt-Sequenz wurde der Vektor mit Bsu36I innerhalb der GPRopt-Sequenz und mit BamHI direkt nach dem Stopp-Codon gespalten, über ein Gel aufgereinigt und mit entsprechenden Oligonukleotiden ligiert, Abbildung 39. Die sequenzoptimierte GPR22- cDNA mit N-terminaler Melittinisiganalsequenz und C-terminalem 6x HisTag wird im Folgenden als \*GPRopt\* bezeichnet.



**Abbildung 39: GPRopt-, Melittinsignalsequenz und HisTag enthaltender pMA-Vektor nach Spaltung der Plasmidklone 1 und 2 mit Bsu36I und BamHI.**

Die Fragmentgrößen betrugen 39 kb und 3739 kb. Nur das größere Fragment ist zu sehen.

**Melittinsignalsequenz**

M \_ K \_ F \_ L \_ V \_ N \_ V \_ A \_ L \_ V \_ F \_ M \_ V \_ V \_ Y \_ I \_ S \_ Y \_ I \_ Y \_  
 ATGAAATTCTTAGTCAACGTTGCCCTTGTTTTATGGTCGTATACATTTCTTACATCTAT

<i>Spaltstelle</i>	<i>GPRopt</i>	<i>6x HisTag</i>	<i>Stopp</i>
A _ A _ A _ E _ L _ A _ T _ M _ C _ F _ . . . V _ T _ D _ H _ H _ H _ H _ H _ H _ *			
GCGGCCGCT	GAGCTTGCCACC	ATGTGCTTC . . . GTGACAGAC	CATCACCATCATCATCAC TGA

**Abbildung 40: Darstellung der zur GPRopt-Sequenz hinzugefügten Melittinsignalsequenz und dem 6x HisTag.**

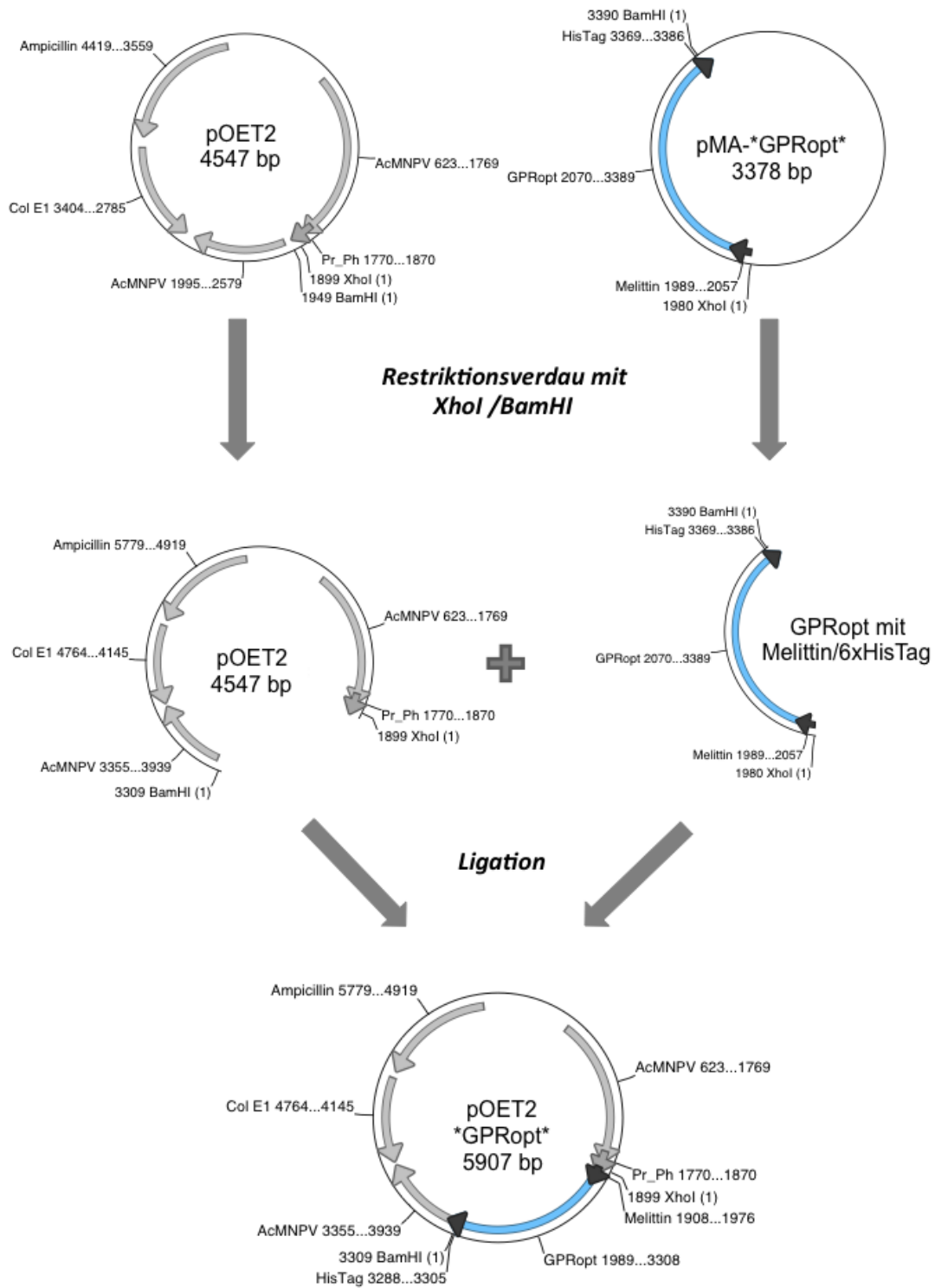
▼ Stellt die Spaltstelle für Signalpeptidasen dar

### 3.4.2 Expression des GPR22-Rezeptors in Sf9-Insektenzellen

#### 3.4.2.1 Umklonierung in einen Transfervektor für die Insektenzellexpression

Für eine Expression in Insektenzellen wurde \*GPRopt\* in den Transfervektor pOET2 umkloniert. Dies war Voraussetzung für die Herstellung von Baculoviren mit dem flashBAC-Ultra System von Oxford Expression Technologies, Inc. (vgl. Kapitel 2.3.18). Zwei das Zielgen (\*GPRopt\*) flankierende *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)-Sequenzen im pOET2-Vektor ermöglichten die Übertragung des Zielgens in Virus-DNA.

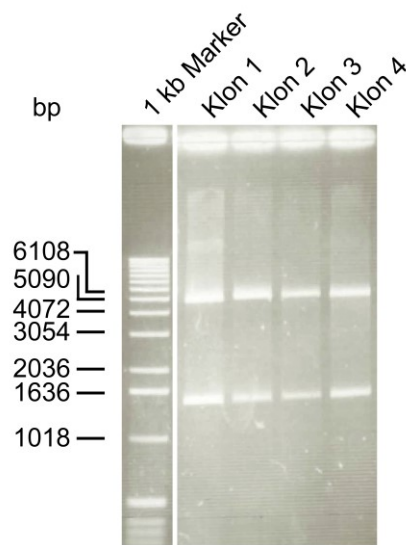




**Abbildung 41: Klonierungsschema zur Umklonierung von \*GPRopt\* in den Transfervektor pOET2 für eine Insektenzelleexpression.**

Legende: Ampicillin = Resistenzgen und Col E1 = Replikationsursprung aus Bakterien sind für die Selektion in *E. coli*; AcMNPV = *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus = die multiple cloning site flankierende Rekombinationsstellen, und Pr\_Ph = AcMNPV polyhedron promotor.; XhoI und BamHI = Restriktionsschnittstellen für die Klonierung.

Um \*GPRopt\* in pOET2 zu transferieren, wurden sowohl pOET2 als auch der \*GPRopt\*-tragende pMA-Vektor mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI geöffnet, Abbildung 41. Die modifizierte GPRopt-Sequenz wurde durch Ligation mit pOET2 verbunden und dann in *E.coli* amplifiziert. Mittels CTAB-Methode wurden entsprechende Plasmid-DNA aus den *E.coli*-Kulturen gewonnen. Zur Kontrolle richtiger Plasmidklone wurde eine Testspaltung mit XhoI und BamHI durchgeführt, Abbildung 42. Alle untersuchten Klone schienen das richtige Insert (\*GPRopt\*; 1401 bp) zu tragen. Der Restvektor von pOET2 hatte eine Größe von ~4,5 kb. Jeweils zwei ausgewählte Klone wurden anschließend sequenziert (AGOWA, LCG Genomics, Berlin). Die Sequenzen stimmten mit der theoretischen Sequenz überein.



**Abbildung 42: Testspaltung von pOET2 mit \*GPRopt\* mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI**

Dargestellt sind vier verschiedene Plasmidklone, die mittels CTAB-Methode aufgereinigt wurden. Die Fragmentgrößen betrugen 1410 bp und 4497 kb.

Nach einer Maxipräparation von \*GPRopt\*-tragenden pOET2-Plasmid stand für eine Transfektion von Insektenzellen eine Konzentration von 2,8 µg/µl zur Verfügung.

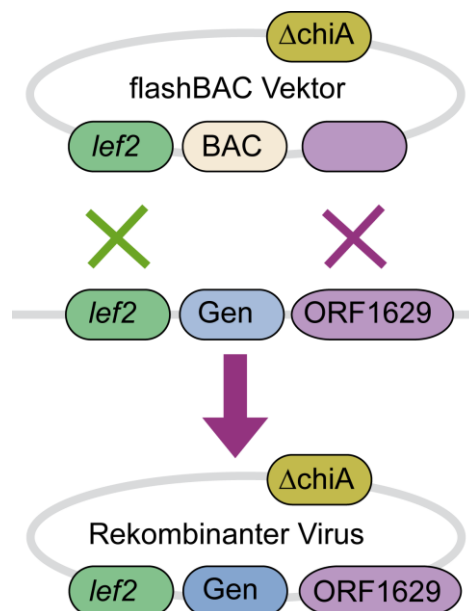
Dieses Plasmid wurde verwendet, um in Sf9-Insektenzellen rekombinante GPRopt/Baculoviren herzustellen (vgl. Methoden 2.4.3 und 2.4.4) und die Zellen letztlich mit Viren für die heterologe Expression zu infizieren (vgl. Methoden 2.4.5).

### 3.4.2.2 Nachweis der GPRopt-Proteinexpression in Sf9-Zellen

#### 3.4.2.2.1 Western Blot Analyse

Der \*GPRopt\*-tragenden pOET2-Vektor ermöglichte eine Kotransfektion mit dem

flashBAC-Vektor zur Herstellung rekombinanter Viren in Insektenzellen. Der flashBAC-Vektor besteht aus einem *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)-Gen, welches durch Deletion funktionslos gemacht wurde und zusätzlich anstelle des Polyhedringens ein „bacterial artificial chromosome“ (BAC) enthält, Abbildung 43. Die Gendeletion verhindert eine Virusreplikation innerhalb der Insektenzellen. Das BAC erhält die virale DNA. Das Polyherdin-Gen ist für die Virusreplikation nicht essentiell. Rekombinanter Virus entsteht letztlich durch die Transfektion von Insektenzellen mit sowohl flashBAC DNA als auch Transfektor (vgl. Methoden 2.3.18). Eine homologe Rekombination stellt die Funktion des AcMNPV - Gens zur Virusamplifikation wieder her und das Zielgen (\*GPRopt\*) wird unter Kontrolle des starken Polyhedrin-Promotors inseriert.



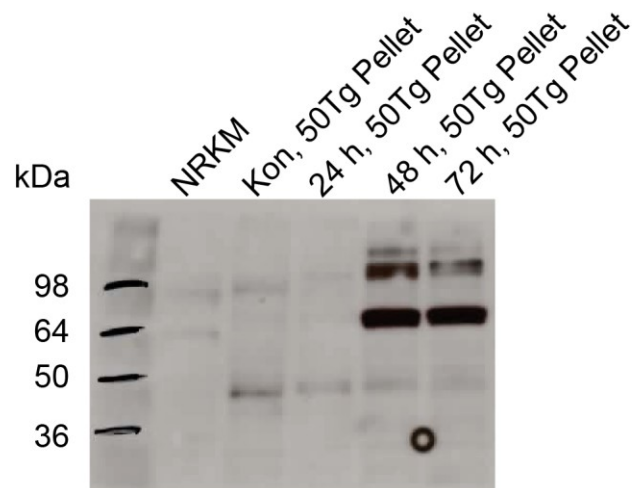
**Abbildung 43: Schematische Darstellung des flashBAC-Systems zur Herstellung rekombinanter Baculoviren.**

Detaillierte Beschreibung im Text. Legende:  $\Delta\text{chiA}$  = chitinase A, lef2 = late expression factor 2, BAC = bacterial artificial chromosome, Gen = heterolog zu exprimierendes Gen und ORF1629 = AcMNPV Genom (Virus-DNA).

Für eine GPR22-Expression wurden Sf9-Insektenzellen mit rekombinanten \*GPRopt\*-Virus infiziert und in Schüttelkulturen kultiviert. Zur Kontrolle der Expression von \*GPRopt\* in Insektenzellen wurden Proben von drei verschiedenen Zeitpunkten (24 h, 48 h und 72 h) nach Infektion mit Virus entnommen und im Western blot untersucht. Als Kontrolle diente Material von parallel angesetzten Sf9-Kulturen, die mit nicht-rekombinanten Virus (Leervirus) infiziert waren. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie in Methoden unter 2.4.5 beschrieben. Als spezifischer Nachweis des heterolog exprimierten \*GPRopt\*s wurde ein anti-Polyhistindin-Antikörper gewählt, der gegen den 6x HisTag gerichtet war. Eine Expression war nach 48 h zu

beobachten, Abbildung 44. Nach 24 h fand in den Zellen noch die Virusvermehrung statt und somit konnte keine Expression nachgewiesen werden. Auch die Leervirus-Kontrolle zeigte kein Signal.

Die prominenten Banden bei 64 kDa (48 h und 72 h) liegen etwas höher als das theoretisch errechnete Molekulargewicht von ~50 kDa. Möglicherweise ist das Protein zusätzlich glykosyliert, was sein Molekulargewicht erhöht. Die bei 98 kDa liegende Bande könnte auf ein Rezeptor-Dimer hindeuten.



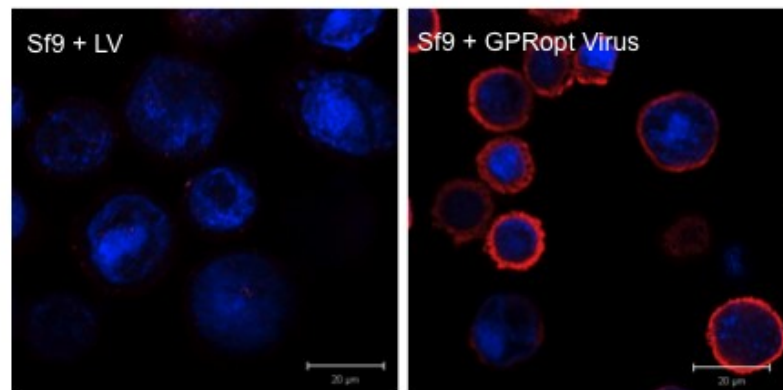
**Abbildung 44: Western blot Analyse von Sf9-Zellen nach Infektion mit GPROpt-Virus**

Der verwendete Antikörper war gegen das im heterolog exprimierten GPROpt enthaltende 6x HisTag gerichtet. Kon = Leervirus infizierte Zellen, 48 h.

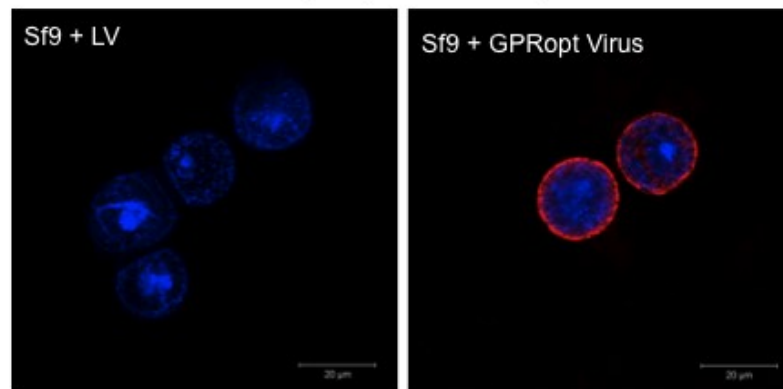
#### 3.4.2.2.2 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte die Expression von GPR22 in Sf9-Insektzellen bestätigt werden. Der Nachweis des Proteins in Sf9-Zellen, die mit rekombinanten \*GPROpt\*-Virus infiziert waren, wurde mit zwei verschiedenen spezifischen primären Antikörpern durchgeführt. Das heterolog exprimierte Protein wurde sowohl mittels Antikörper, der gegen den 6xHisTag gerichtet war, detektiert (Abbildung 45 oben) als auch mit einem Antikörper, der gegen eine intrazelluläre Domäne des Proteins gerichtet war (Abbildung 45 unten). Als Kontrollen dienten auch hier Sf9-Zellen, die mit Leervirus infiziert waren. Beide Antikörperbehandlungen zeigten die gleiche Färbung, was auf eine echte Expression des \*GPROpt\*-Proteins hinweist. Weiterhin deutet die Färbung der Zellen auf eine Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran hin.

### Anti-Polyhistidin Antikörper



### Anti-GPR22 Antikörper (monoklonal)



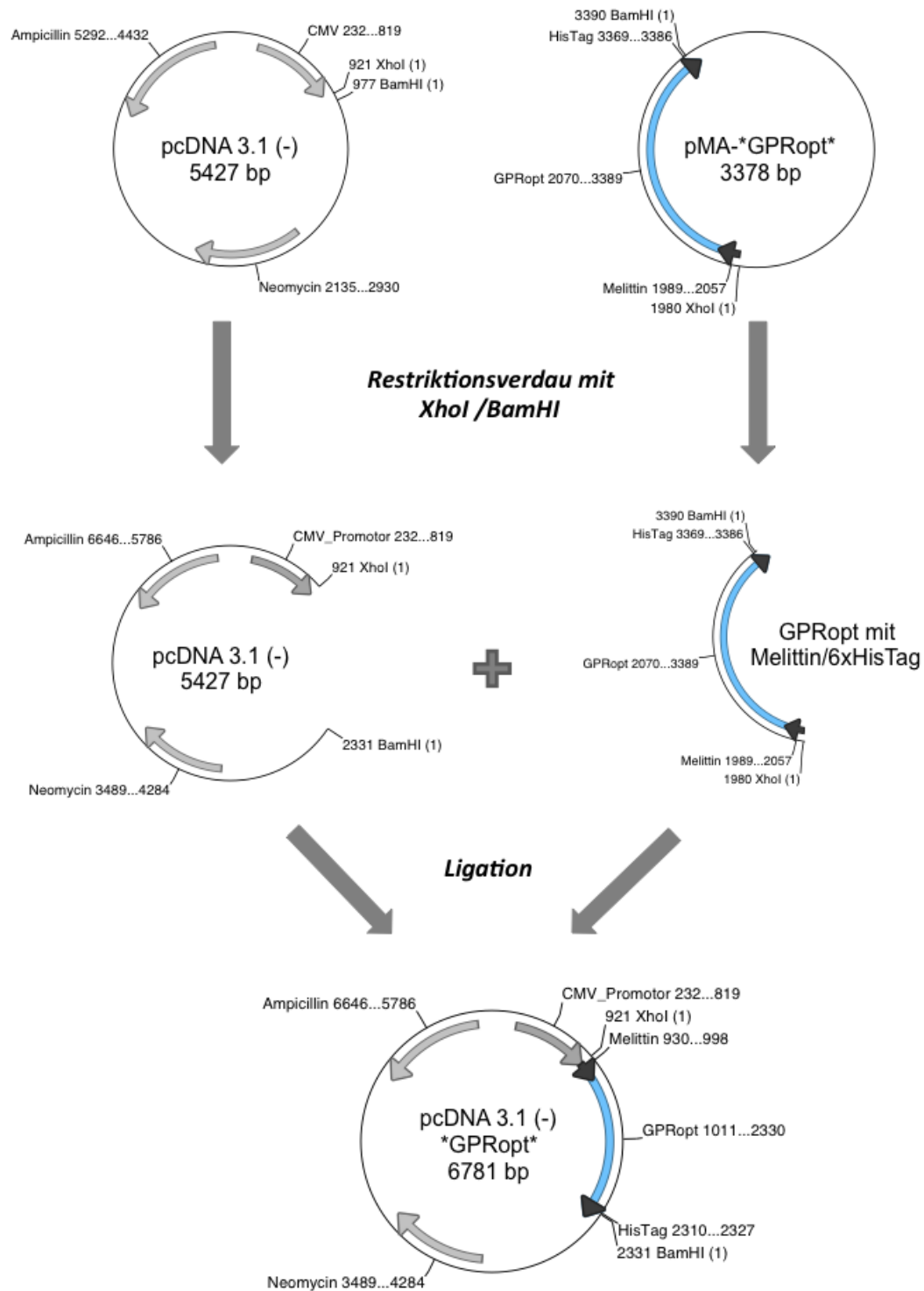
**Abbildung 45: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von GPROpt exprimierenden Sf9-Zellen.**

Die Aufnahmen wurden am LSM700 mit einem Zeiss-Objektiv Plan-Apochromat 63x/1,40 Oil Ph3 erstellt. Der Balken stellt eine Länge von 20 µm dar.

### 3.4.3 Expression des GPR22-Rezeptors in HEK293-Säugerzellen

#### 3.4.3.1 Umklonierung in den Vektor pcDNA3.1(-) für eine Expression in Säugerzellen

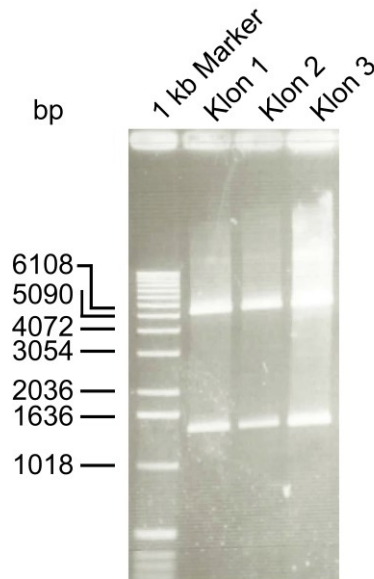
Um \*GPROpt\* in Säugerzellen, hier HEK293, zu exprimieren wurde die Sequenz in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 (-) kloniert, Abbildung 46. Dafür wurde der Vektor pcDNA 3.1 (-) mit XhoI und BamHI geöffnet. Auch der pMA-Vektor mit modifizierter GPROpt-Sequenz wurde mit diesen Restriktionsenzymen behandelt, um die GPROpt-Sequenz aus dem pMA-Vektor herauszuholen. Die GPROpt-Sequenz wurde dann durch Ligation mit pcDNA 3.1 (-) verbunden und in *E.coli* amplifiziert.



**Abbildung 46: Klonierungsschema zur Umklonierung von \*GPRopt\* in den Expressionsvektor pcDNA3.1(-) für eine Expression in Säugerzellen.**

Zur Kontrolle richtiger Plasmidklone wurde eine Testspaltung mit *XhoI* und *BamHI* durchgeführt, Abbildung 47. Alle untersuchten Klone schienen das richtige Insert zu tragen (1401 bp). Der Restvektor von pcDNA 3.1 (-) hatte eine Größe von 5380 bp.

Jeweils zwei ausgewählte Klone wurden anschließend sequenziert (AGOWA, LCG Genomics, Berlin). Die Sequenzen stimmten mit der theoretischen Sequenz überein.



**Abbildung 47: Testspaltung von pCDNA 3.1 (-) mit \*GPRopt\* mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI.**

Dargestellt sind drei verschiedene Plasmidklone.

Nach einer Maxipräparation von kloniertem pcDNA 3.1 (-) Plasmid stand für die Transfektion von Säugerzellen eine Menge von 2,13 µg/ml zur Verfügung.

#### 3.4.3.2 mRNA- und Proteinexpression von GPRopt in HEK293-Zellen

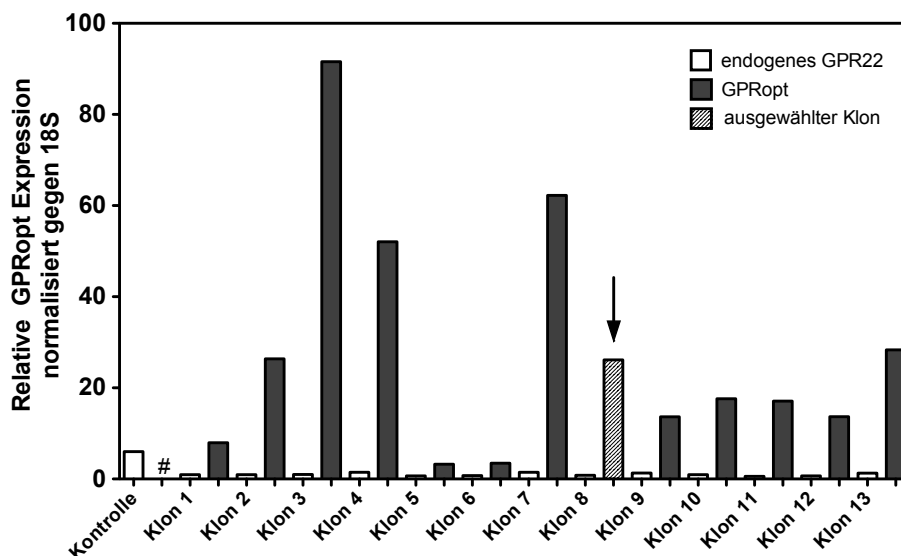
Mit Erhalt des Expressionsvektors pcDNA 3.1 (-) mit der \*GPRopt\* -Sequenz konnten HEK293-Zellen transfiziert werden. Als Kontrollen dienten Wildtypzellen.

Ziel der Transfektion war es stabile Klone heranzuziehen, die die modifizierte GPR22-Sequenz exprimierten. Im pcDNA 3.1 (-) Vektor enthalten ist eine Neomycinresistenz, die man zur Selektion stabil transfizierter Zellklone verwenden kann. Aus diesem Grund wurde das Medium nach Transfektion mit dem Antibiotikum G418 als Selektionsdruck versetzt. Zusätzlich wurden die Zellen vereinzelt, damit theoretisch aus nur einer Zelle ein Klon heranwachsen konnte. Nur stabil transfizierte Zellen sollten unter Selektionsdruck überleben und sich weiter vermehren können. Trotz des Selektionsdrucks (400 µg/ml G418) können Kulturen entstehen, die zwar resistent gegenüber der Antibiotikabehandlung sind, aber das Zielgen (\*GPRopt\*) nicht exprimieren.

### 3.4.3.2.1 mRNA-Analyse

Zunächst wurde mRNA der verschiedenen Klone, die wir nach Selektion erhielten, mittels qRT-PCR auf Expression von \*GPRopt\* untersucht.

In Abbildung 48 ist der Vergleich zwischen der Expression des endogenen Rezeptors mit der Expression von \*GPRopt\* gezeigt. Die getesteten Klone zeigten eine unterschiedlich starke mRNA-Expression von \*GPRopt\*. Endogen war der GPR22-Rezeptor in HEK293-Zellen nur sehr gering exprimiert.



**Abbildung 48: mRNA-Analyse verschiedener HEK293-Klone nach stabiler Transfektion mit GPRopt.**

Die Werte entstanden aus biologischen Triplikaten und einer technischen Doppelbestimmung aller Proben in der qRT-PCR.

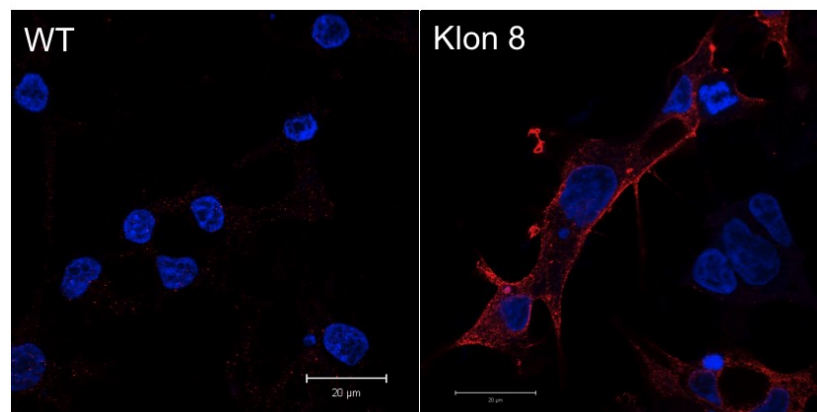
### 3.4.3.2.2 Immunfluoreszenz

Die mRNA-Analyse allein gibt nur Auskunft darüber, ob entsprechende mRNA für die Translation vorhanden ist. Für eine Aussage der tatsächlichen Proteinexpression wurden die verschiedenen Klone mittels Immunfluoreszenz untersucht.

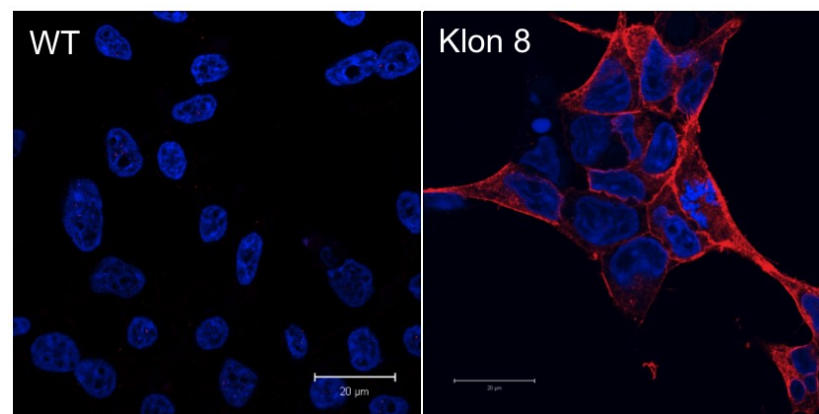
Im Folgenden ist das Beispiel eines ausgewählten Klons (Abbildung 49) gezeigt, der die für HEK293-Zellen typische Morphologie zeigte und trotz Selektionsdrucks eine schnelle Replikationszeit aufwies. Der Klon 8 und die als Kontrolle verwendeten Wildtypzellen (WT) wurden für die Analyse mittels Immunfluoreszenz mit Antikörper gegen das im \*GPRopt\*-enthaltende 6x HisTag (oben) und mit GPR22-Rezeptor-spezifischen Antikörper (unten) gefärbt. Beide primären Antikörper zeigten die gleiche Färbung, was auf eine echte Expression des \*GPRopt\*s hindeutet. Die Kontrollzellen zeigten keine Färbung.



### Anti-Polyhistidin Antikörper



### Anti-GPR22 Antikörper (monoklonal)

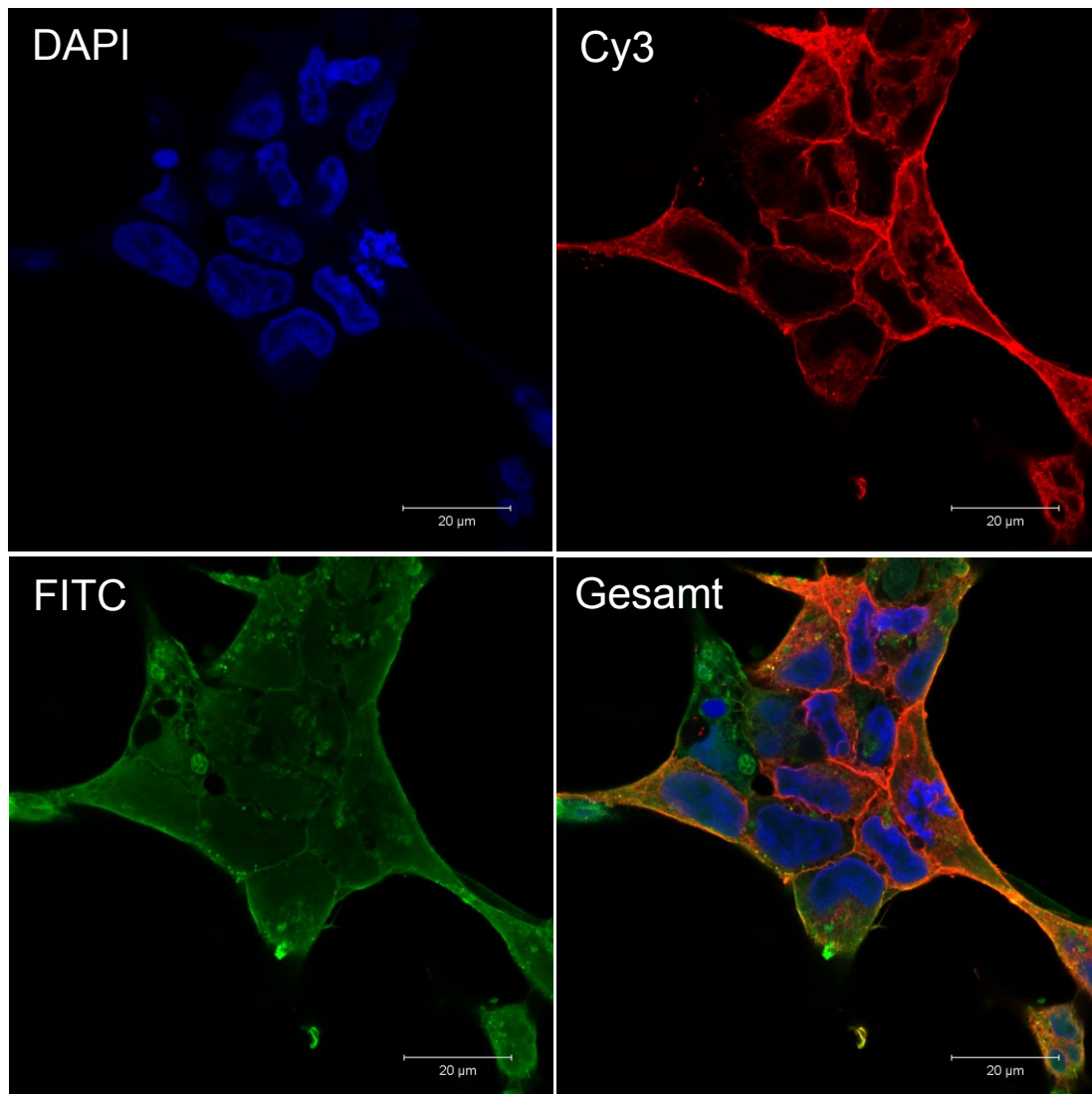


**Abbildung 49: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von \*GPRopt\* exprimierenden HEK293-Zellen.**

Die Aufnahmen wurden am LSM700 mit einem Zeiss-Objektiv Plan-Apochromat 63x/1,40 Oil Ph3 erstellt. Der Balken stellt eine Länge von 20 µm dar.

#### 3.4.3.2.3 Kolokalisation

GPR22 ist ein 7-transmembranspannendes Protein, dessen Lokalisation als reifes Protein in der Plasmamembran zu vermuten wäre. Um eine mögliche Assoziation von GPR22 mit der Plasmamembran zu zeigen, wurde zusätzlich die Plasmamembran der heterolog exprimierenden Zellen von Klon 8 mit *Fluorescein isothiocyanate* (FITC, grün) markiert (vgl. Methoden 2.6.6). In Abbildung 50 ist zu sehen, dass sich die Membranmarkierung (FITC, grün) mit der Färbung des Rezeptors (Cy3, rot) überlagerte. Die überlagerten Bereiche erschienen im Gesamtbild gelblich und deuten darauf hin, dass GPR22 tatsächlich an der Plasmamembran zu finden war.



**Abbildung 50: Plasmamembranlokalisierung von GPR22 in HEK293-Zellen.**

Mit Klon 8 wurde eine Plasmamembranfärbung durchgeführt (FITC), um eine Kolokalisation mit GPR22 (Cy3, monoklonaler anti-GPR22-Antikörper) zu zeigen. Als Gegenfärbung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Die Aufnahmen wurden am LSM700 mit einem Zeiss-Objektiv Plan-Apochromat 63x/1,40 Oil Ph3 erstellt.

#### 3.4.4 Ligandenbindungstests

Zur Verifizierung des möglichen Rezeptorkandidaten GPR22 wurden erste Bindungstests durchgeführt. Der potentielle Ligand von GPR22, 17,18-EEQ, stand für die Bindungstests leider nicht Tritium-markiert zur Verfügung. Als Ersatz für 17,18-EEQ haben wir den von der AA-abgeleiteten CYP-abhängigen Epoxymetaboliten 14,15-EET verwendet. Diesen Metaboliten konnten wir selbst mittels chemischer Synthese aus Tritium-markierter AA herstellen (Methoden 2.9).

Ziel der Bindungstests war die Klärung der Fragen ob (i) GPR22-exprimierende Zellen mehr Epoxymetabolit ( $[^3\text{H}]$ -14,15-EET) binden würden als die Kontrollzellen, (ii) ob

die Bindung spezifisch und/oder reversibel ist und (iii) ob die Bindung stereospezifisch ist. Die Ligandenbindung plus Vehikel stellte dabei die totale Bindungskapazität dar. Eine Verdrängung der Bindung mit nicht-markiertem Liganden im Überschuss diente dazu unspezifische Bindung zu identifizieren. Die spezifische Bindung wurde als totale Bindung abzüglich der unspezifischen Bindung definiert.

Im Folgenden sind die Ergebnisse erster Versuche mit Sf9-Insektenzellen (Kapitel 3.4.4.1) und HEK293-Zellen (Kapitel 3.4.4.2) dargestellt. Die Ergebnisse zeigten eine vermehrte Bindung des Liganden an GPR22-exprimierende Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Bindung konnte durch Verdrängung mit nicht-markierten AA- und EPA-abgeleiteten Epoxymetaboliten reduziert werden.

#### 3.4.4.1 Bindungsstudien mit Sf9-Insektenzellen

Ein erster Bindungstest mit Sf9-Zellen wurde mit ganzen Zellen durchgeführt. Dabei kamen Sf9-Zellen zum Einsatz, die entweder mit GPRopt-Virus oder als Kontrolle mit Leervirus infiziert wurden. Für den Test wurden die Zellen nach 48 h nach Virusinfektion geerntet (vgl. Methoden 2.9.3). Getestet wurde die Bindung der Enantiomere von [ $^3\text{H}$ ]-14,15-EET mit (i) Ethanol als Vehikel, (ii) nicht-markiertem Liganden im Überschuss (10  $\mu\text{M}$ ) und (iii) dem vermeintlichen endogenen Liganden 17,18-EEQ (100 nM).

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass GPRopt exprimierende Zellen mehr Liganden binden als die Leervirus infizierten Zellen, Tabelle 14. Durch Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  nicht-markierten 14,15-EET wurde die spezifische Bindung ermittelt. Die Reduktion der spezifischen Bindung durch 100 nM 17,18-EEQ bei den Kontrollzellen war für beide Enantiomere ungefähr gleich. Es erfolgte eine Reduktion um 28,1 % bei Inkubation mit [ $^3\text{H}$ ]-14(S),15(R)-EET und um 32,9 % bei Inkubation der Zellen mit [ $^3\text{H}$ ]-14(R),15(S)-EET, Tabelle 14. Die mit GPRopt-Virus infizierten Zellen hingegen zeigten hinsichtlich der beiden Enantiomere einen deutlichen Unterschied in der Verdrängung der spezifischen Bindung. Das [ $^3\text{H}$ ]-14(S),15(R)-Enantiomer wurde von 100 nM 17,18-EEQ um 61,0 % verdrängt, wohingegen die spezifische Bindung des [ $^3\text{H}$ ]-14(R),15(S)-Enantiomers um 13,3 % reduziert wurde.

Sowohl Leervirus-infizierte Sf9-Zellen als auch GPRopt-exprimierende Zellen haben mehr vom [ $^3\text{H}$ ]-14(S),15(R)-Enantiomer als vom [ $^3\text{H}$ ]-14(R),15(S)-Enantiomer gebunden.

**Tabelle 14: Spezifische Bindung der [3H]-14,15-EET Enantiomere an Sf9-Zellen**

Die Messung erfolgte in technischen Triplikaten.

Ligand	Sf9-Zellen infiziert mit	Spezifische Bindung [fmol/10 <sup>6</sup> Zellen]	Bindung nach Inkubation mit 17,18-EEQ [fmol/10 <sup>6</sup> Zellen]	% Verdrängung
[3H]-14(S),15(R)-EET	Leervirus	266	191	28,1
	GPRopt	641	250	61,0
[3H]-14(R),15(S)-EET	Leervirus	184	124	32,9
	GPRopt	521	452	13,3

#### 3.4.4.2 Bindungsstudien HEK293-Säugerzellen

Für einen ersten Bindungstest mit HEK293-Zellen wurden ein stabil transfizierter Klon und Wildtypzellen (WT) als Kontrolle verwendet. Auch hier wurden ganze Zellen für den Versuch genommen. Mittels Bestimmung der optischen Dichte wurde die Menge der verwendeten Zellen eingestellt (vgl. Methoden 2.9.3). Getestet wurde die Bindung der Enantiomere von [3H]-14,15-EET mit (i) Ethanol als Vehikel, (ii) nicht-markiertem Liganden im Überschuss (10 µM) und (iii) 17,18-EEQ (100 nM).

Die Ergebnisse zeigten, dass der stabil transfizierte Klon unabhängig vom Stereoisomer deutlich mehr [3H]-markierten Liganden gebunden hatte als die WT-Zellen. Die Zugabe von 10 µM nicht-markierten 14,15-EET ermöglichte die Identifizierung der spezifischen Bindung des [3H]-markierten Liganden.

Die Reduktion der spezifischen Bindung in den Kontrollzellen durch Inkubation mit 100 nM 17,18-EEQ schien für die Stereoisomere ungefähr gleich zu sein. Es erfolgte eine Reduktion der [3H]-14(S),15(R)-EET-Bindung um 37,6 % und der [3H]-14(R),15(S)-EET-Bindung um 32,1 %, Tabelle 15. Der Klon zeigte ein umgekehrtes Verhältnis in der Reduktion der spezifischen Bindung mit 100 nM 17,18-EEQ. Die [3H]-14(S),15(R)-EET-Bindung wurde nur um 24,% reduziert, während die Verdrängung des [3H]-14(R),15(S)-Enantiomers um 31,9 % reduziert wurde, Tabelle 15.

Anders als beim Bindungsversuch mit Sf9-Zellen hatten sowohl WT-Zellen als auch GPRopt-exprimierende Zellen mehr vom [3H]-14(R),15(S)-Enantiomer als vom [3H]-14(S),15(R)-Enantiomer gebunden.

**Tabelle 15: Spezifische Bindung der [3H]-14,15-EET Enantiomere an HEK293-Zellen**

Die Messung erfolgte in technischen Triplikaten.

Ligand	HEK293	Spezifische Bindung [fmol/10 <sup>6</sup> Zellen]	Bindung nach Inkubation mit 17,18-EEQ [fmol/10 <sup>6</sup> Zellen]	% Verdrängung
[ <sup>3</sup> H]- 14(S),15(R)-EET	WT	200	125	37,6
	GPRopt	713	540	24,3
[ <sup>3</sup> H]- 14(R),15(S)-EET	WT	352	239	32,1
	GPRopt	724	493	31,9

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Ligandenbindungsspezifität in Sf9- und HEK293-Zellen zeigten, dass heterolog exprimierende Zellen wesentlich mehr Liganden gebunden hatten als die jeweiligen Kontrollzellen. Die spezifische Bindung ließ sich durch Zugabe von 100 nM 17,18-EEQ deutlich reduzieren.

## 4 Diskussion

### 4.1 Beeinflussung der Fettsäurezusammensetzung und des endogenen CYP-Eicosanoidprofils durch EPA/DHA-Supplementation im Menschen

Ergebnisse zu Untersuchungen mit rekombinanten CYP-Enzymen [109] und aus einer Fütterungsstudie mit Ratten [109], die in der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, gaben Anlass zu der Annahme, dass auch im Menschen möglicherweise das endogene CYP-Eicosanoidprofil über die Verfügbarkeit der Vorläuferfettsäuren beeinflusst wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine klinische Studie mit 20 gesunden Teilnehmern (je 10 Männer und Frauen) durchgeführt, die für acht Wochen eine Supplementation mit EPA/DHA erhielten.

#### 4.1.1 Effekt der Omacor®-Gabe auf die Fettsäurezusammensetzung

##### 4.1.1.1 Veränderungen im Omega-3 Index

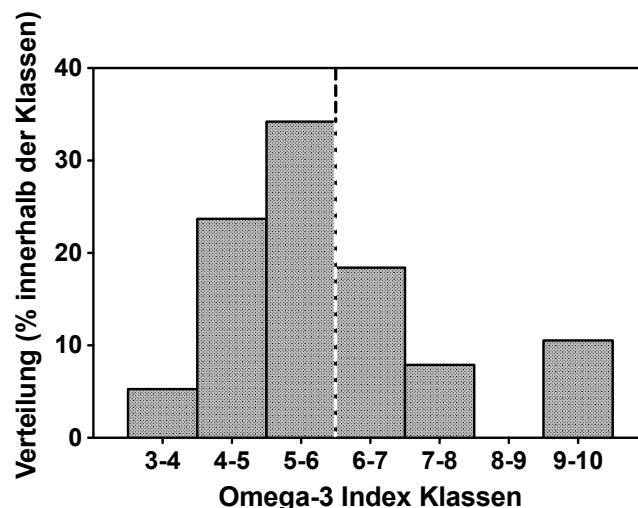
Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit menschlichen Gewebes für Untersuchungen, ist nur wenig über den n-3 PUFA Gehalt in verschiedenen Organen des Menschen bekannt. Jedoch wurde mit Hilfe von Biopsien herausgefunden, dass der EPA- und DHA-Gehalt nach Fischölgabe im menschlichen Herzmuskel oder in Skelettmuskeln anstiegen [43, 186]. Dabei wurde gezeigt, dass der n-3 PUFA-Gehalt (v.a. von Herzwewebe) sehr gut mit dem n-3 PUFA-Gehalt in Erythrozyten korrelierte. Dieser Zusammenhang wurde genutzt, um einen neuen Biomarker, den Omega-3 Index, zu entwickeln [42, 43, 176]. Der Omega-3 Index von Erythrozyten dient als Maß für die langfristige Einlagerung der n-3 PUFAs in verschiedenen Geweben/Organen (siehe Einleitung Kapitel 1.1). Ein Ziel der durchgeführten Studie war es Veränderungen des Omega-3 Index von gesunden Probanden in Abhängigkeit einer Supplementation mit n-3 PUFAs zu beobachten.

Der Omega-3 Index der Studienteilnehmer stieg nach acht Wochen Omacor®-Gabe von  $4,9 \pm 0,2$  auf einen Wert von  $8,3 \pm 0,3$  an, Abbildung 11 A. Nach Absetzen der Medikation war der Omega-3 Index wieder reduziert, blieb aber zu den Basalwerten signifikant erhöht. Möglicherweise trägt das im Vergleich zu EPA langsamere Auswaschen von DHA aus Plasma oder Erythrozyten zu dem nicht vollständigen Rückgang bei [1]. Insgesamt deuten die Ergebnisse des Omega-3 Index darauf hin, dass der Gehalt an EPA und DHA mit entsprechender Supplementation ansteigt. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Anstieg des Omega-3 Index auch von der eingenommenen Dosis abhing, Abbildung 11 B. Je höher die eingenommene Dosis

war, desto höher war der erreichte Omega-3 Index nach achtwöchiger Supplementation.

Interessanterweise stieg der Omega-3 Index der Studienteilnehmer zwar nach vier Wochen 1 g Omacor®/Tag deutlich an ( $6,8 \pm 0,1$ ), erreichte aber kein Aufnahmeplateau, denn die Gabe weiterer vier Wochen der doppelten Dosis (2 g Omacor®/Tag) erhöhte den Omega-3 Index aller Probanden weiter auf  $> 8$ , Abbildung 11 A. Möglicherweise war auch nach der achtwöchigen Behandlung der Probanden mit EPA/DHA noch keine maximale Aufnahme erreicht. Eine klinische Studie zur Aufnahmekinetik von EPA und DHA (je 3 g/d) in Plasma und Membranphospholipiden zeigte, dass EPA nach sechs Wochen und DHA erst nach 18 Wochen eine Sättigung erreichten [187].

Studien belegen, dass ein Omega-3 Index  $> 8$  ein 10-fach niedrigeres Risiko für einen plötzlichen Herztod darstellt als ein Omega-3 Index  $< 4$  [188]. Demnach konnte durch die achtwöchige Behandlung der Probanden mit EPA/DHA ein schützender Omega-3 Index  $> 8$  erreicht werden. Die Dosis zur Erreichung/Erhaltung eines Omega-3 Index  $> 8$  hängt laut einer neueren Studie maßgeblich vom basalen n-3 PUFA Status ab [189]. Bei gleichen diätischen Dosen steigt der Omega-3 Index bei n-3 PUFA defizienten Menschen deutlich stärker an als bei Menschen, die ohnehin einen hohen Omega-3 Index aufweisen. Womöglich profitieren von einer EPA/DHA-Supplementation demzufolge nur Menschen mit einem niedrigen Omega-3 Index [44, 190]. Zur besseren Beobachtung der Veränderungen im Fettsäureprofil wurden aus diesem Grund nur Probanden mit einem basalen Omega-3 Index  $< 6$  in die Studie mit eingeschlossen, **Abbildung 51**. Der basale n-3 PUFA Status ist auch ein wichtiges Kriterium bei der Betrachtung und Bewertung von klinischen Studien zum Einfluss von n-3 PUFAs auf kardiovaskuläre Ereignisse, denn in den meisten Studien blieb der basale n-3 PUFA Status unbeachtet und führte somit letztlich zu unterschiedlichen Bewertungen einer n-3 PUFA Intervention.



**Abbildung 51: Häufigkeitsverteilung des Omega-3 Index**

Die Häufigkeitsverteilung des Omega-3 Index wurde mit allen freiwilligen Teilnehmern zur Voruntersuchung durchgeführt (n=38). Nur Teilnehmer mit einem Omega-3 Index < 6% (Grenze = gestrichelte Linie) wurden in die Studie mit eingeschlossen (n=20).

Neben einigen anderen Faktoren (wie z.B. Alter, Diabetes, BMI) beeinflusst auch das Geschlecht den Omega-3 Index. Frauen haben einen um 0,5 % höheren Omega-3 Index als Männer [191]. Die Ergebnisse der klinischen Studie bestätigen diesen Befund. Der Omega-3 Index acht Wochen nach Medikation lag bei den Frauen bei  $8,8 \pm 0,3$  und bei Männern, wenn auch nicht signifikant ( $p=0,085$ ), um 0,8 niedriger ( $8,0 \pm 0,3$ ) als bei den Frauen. Weitere Untersuchungen mit größeren Gruppengrößen sind notwendig, um den Geschlechterunterschied besser charakterisieren zu können. Möglicherweise lagern Frauen bei entsprechender Verfügung von n-3 PUFAs diese auch schneller in Membranphospholipide ein. Es ist bekannt, dass geschlechterspezifische Unterschiede in der Rate der  $\beta$ -Oxidation, Zusammensetzung des Fettgewebes und der Mobilisierung von Fett bestehen. Weiterhin beeinflussen Sexualhormone die Aktivität von Enzymen (Desaturasen und Elongasen), die an der Synthese von langkettigen n-3 PUFAs beteiligt sind [1, 192, 193].

#### 4.1.1.2 Beeinflussung des Fettsäureprofils

Bei Betrachtung der einzelnen Fettsäuren fiel auf, dass die n-6 PUFA AA über den gesamten Studienverlauf die dominierende PUFA war, Abbildung 12. Übereinstimmend mit Daten aus der Literatur und einer von der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführten Fütterungsstudie an Ratten [109], wurde auch in der klinischen Studie eine statistisch signifikante Reduktion des relativen AA-Gehalts durch eine EPA/DHA Supplementation beobachtet, Abbildung 12. Es fand also auch hier ein partieller Ersatz von AA durch EPA und DHA in den Membranphospholipiden



statt, der für alle Studienteilnehmer signifikant war. Trotz signifikanten Anstiegs blieb der relative EPA- bzw. DHA-Gehalt in Erythrozyten 6,8-fach bzw. 2,6-fach unter dem relativen AA-Gehalt, Tabelle 11.

In der Literatur wird ein ~10-fach höherer DHA-Gehalt gegenüber EPA in humanen Herzen und Erythrozyten beschrieben [194]. Nach EPA/DHA-Supplementation zeigt EPA jedoch relativ gesehen einen wesentlich höheren Anstieg [43, 195]. Dies konnte ebenfalls in der hier vorgestellten Studie beobachtet werden. Denn lag der DHA-Gehalt zu Basalbedingungen noch ~6,2-fach höher als der EPA-Gehalt, war er nach acht Wochen Supplementation nur noch ~2,6-fach höher. In einer klinischen Studie wurde gezeigt, dass die Zufuhr von 0,6 g/d EPA und 0,4 g/d DHA für 6 Monate zu einem Anstieg von > 300 % des kardialen EPAs und nur ~50 % des kardialen DHAs führte [43]. Ähnliche Studien mit höheren Dosen EPA/DHA bestätigen diesen Befund [195, 196]. Damit übereinstimmend zeigte sich in der hier vorgestellten Studie ein Anstieg von EPA nach acht Wochen Medikation um 236 % und DHA um 44 % im Plasma. Es gibt Hinweise darauf, dass DHA über  $\beta$ -Oxidation zurück zu EPA umgewandelt wird. Zirkulierendes EPA jedoch wird womöglich aufgrund der geringen enzymatischen Aktivität entsprechender Elongasen und Desaturasen in Säugern (insbesondere im Menschen) kaum zu DHA verlängert [1]. Womöglich sind schon geringe Veränderungen des EPA-Gehalts physiologisch bedeutsam. Nach PLA<sub>2</sub>-induzierter Freisetzung aus Membranphospholipiden stehen EPA und DHA auch zur Umsetzung durch COX-, LOX- und CYP-Enzyme zur Verfügung. EPA kann zu biologisch aktiven Eicosanoiden metabolisiert werden, die zu AA-abgeleiteten Eicosanoiden oft entgegengesetzte Wirkung zeigen (siehe Einleitung Kapitel 1.2).

Eine weitere langkettige PUFA, die durch diätische Einflüsse verändert wird, ist die Docosapentaensäure (DPA, C22:5). Sie kann sowohl als n-6 als auch als n-3 PUFA vorliegen, Tabelle 11. Neben EPA und DHA stieg v.a. der DPAn-3 - Gehalt in den Probanden nach EPA/DHA-Supplementation signifikant an. Der DPAn-6 - Gehalt hingegen war deutlich niedriger und blieb durch die Behandlung unverändert. DPAn-6 ist normalerweise nicht im Organismus vorhanden. Bei einem Mangel an n-3 PUFAs wird DPAn-6 aus AA synthetisiert und als DHA-Ersatz verwendet [62]. DPAn-3 hingegen ist die in Fischöl am dritt-häufigsten auftretende FS und kann so über die Nahrung aufgenommen werden. DPAn-3 kann aber auch über Kettenverlängerung aus EPA synthetisiert werden und stellt zudem ein Zwischenprodukt auf dem Weg zur DHA-Synthese dar. Im Menschen korreliert der Gehalt an zirkulierendem DPAn-3 mit zirkulierendem EPA [197]. Da die Probanden kein zusätzliches DPA aufgenommen hatten, ist diese Beobachtung womöglich auf eine endogene *de novo* Synthese von DPAn-3 aus EPA oder durch den Prozess der Retrokonversion aus

DHA zurückzuführen [198, 199]. Ein Mechanismus, der sich auch bei den untersuchten Probanden durch den Anstieg von DPAn-3 in Erythrozyten wiederfinden lässt. Insgesamt ist nur wenig über die physiologische Bedeutung von DPAn-3 bekannt, jedoch wird eine schützende Wirkung bei Entzündungen vermutet. Eine erhöhte Konzentration sowohl von zirkulierendem EPA als auch DPAn-3 ist mit einer Reduktion nicht-letaler kardiovaskulärer Ereignisse, wie MI [200] und der Inzidenz von HF [201], assoziiert. Kürzlich veröffentlichte Daten zeigen zudem, dass DPA ähnlich wie EPA und DHA als Vorläufer für potente anti-inflammatorische und entzündungsauflösende Metabolite (entsprechend den Resolvinen, Protectinen und Maresinen) dienen kann [202].

#### **4.1.2 Effekt der Omacor®-Gabe auf n-3 PUFA abgeleitete Metabolite**

##### *4.1.2.1 Veränderungen im CYP-Eicosanoidprofil*

Essentielle FS konkurrieren nicht nur um den Einbau in Membranphospholipide, sondern auch als Substrate für CYP-Enzyme. *In vitro* Untersuchungen, auch der eigenen Arbeitsgruppe, zeigten, dass CYP-Enzyme EPA und DHA als alternative Substrate zu AA akzeptieren und sie zu entsprechenden CYP-Eicosanoiden metabolisieren [90, 91, 109]. Daher wurde vermutet, dass eine Supplementation mit n-3 PUFA modulierend auf die Bildung endogener CYP-Eicosanoide wirkt. Erste Hinweise auf die Entstehung von CYP-abhängigen n-3 PUFA-abgeleiteten Metaboliten (EEQs von EPA oder EDPs von DHA) *in vivo* gaben Arbeiten, die diese Metabolite nach n-3 PUFA Gabe in humanen Urin [203], Plasma [189, 204-206] oder Serum [207] identifiziert haben. Um die durch Omacor®-Gabe bewirkte Veränderung des CYP-Eicosanoidprofils in der durchgeführten klinischen Studie zu bewerten, wurde der sogenannte CYP-Eicosanoid-Index eingeführt (Berechnung siehe Methoden 2.2.3).

Der CYP-Eicosanoid-Index stieg ähnlich dem Omega-3 Index bereits nach einer Woche signifikant an und stieg nochmals deutlich mit der Gabe der doppelten Dosis bevor er nach Absetzen der Medikation wieder signifikant absank, Abbildung 13 A. Dies deutet auf eine massive endogene Bildung von n-3 PUFA abgeleiteten CYP-Eicosanoiden hin (Abbildung 13 B), die abhängig von der exogenen Zufuhr der Vorläuferfettsäuren ist. Die Summe aus EPA- und DHA-abgeleiteten CYP-Eicosanoiden überstieg nach achtwöchiger EPA/DHA Supplementation sogar den Gehalt an AA-Metaboliten um das 1,4-fache im Plasma und um das 2,2-fache im Urin. Da EPA und DHA deutlich unter dem AA-Gehalt lagen, war dieses Ergebnis so nicht zu erwarten. Es lässt jedoch vermuten, dass EPA und DHA *in vivo* sehr effektive

alternative Substrate für humane CYP-Isoformen darstellen, die mit höherer Effizienz zu ihren entsprechenden Metaboliten umgesetzt werden als AA, Abbildung 16. Die relative Effizienz des Umsatzes von EPA im Vergleich zu AA war dabei ungefähr doppelt so hoch wie die von DHA.

Wo die im Plasma gemessenen CYP-Eicosanoide entstehen, ist bislang unklar. CYP-Enzyme werden v.a. in der Leber exprimiert, treten aber auch in extrahepatischen Geweben wie Lunge, Niere, Gastrointestinaltrakt und im Herzen auf. Eine wichtige Quelle von CYP-Eicosanoiden können aber auch Endothelzellen der Gefäße sein, die in nahezu allen Geweben vorhanden sind. Im menschlichen Genom wurden 57 funktionelle CYP-Gene identifiziert, von denen 12 CYP-Enzyme mit Epoxygenaseaktivität codieren. Unter ihnen scheinen nur CYP-Enzyme der Familie CYP2C (CYP2C8 und CYP2C9) und CYP2J (CYP2J2) von Bedeutung zu sein [208]. Relativ gesehen ist im Herzen die Expression von CYP2J2 stärker als CYP2C8 und in Gefäßendothelzellen ist die Reihenfolge der Expression wie folgt: CYP2C9 > CYP2J2 > CYP2C8 [209]. Das im Endothel exprimierte CYP2C9 neigt im Gegensatz zu CYP2J2 dazu während des katalytischen Zyklus zu entkoppeln und reaktive Sauerstoffspezies zu generieren, was bei erhöhter Enzymaktivität zu entzündlichen Prozessen führen kann [210]. Die im Plasma gemessenen CYP-Eicosanoide sollen Auskunft darüber geben, wieviel der Metabolite systemisch vorhanden sind. Dennoch sind lokale und gewebespezifische Unterschiede zu erwarten, da die Expression und Aktivität der verschiedenen CYP-Enzyme unter der Kontrolle von Hormonen sowie Wachstums- und Transkriptionsfaktoren stehen [85]. Beim *in vitro* Umsatz von AA, EPA bzw. DHA lassen rekombinante CYP-Enzyme abhängig von der Isoform die abgeleiteten regioisomeren Metabolite in einem bestimmten Verhältnis entstehen. Am Beispiel für den CYP-abhängigen Metabolismus von EPA ist aus *in vitro* Untersuchungen bekannt, dass EPA durch CYP2C8 v.a. zu 17,18-EEQ und 14,15-EEQ und zu geringeren Mengen auch zu 11,12-EEQ umgewandelt wird [90, 91]. Durch den Umsatz von EPA durch die CYP-Isoformen CYP2C9 und CYP2J2 entstehen alle vier möglichen regioisomeren Epoxymetabolite. Während das 17,18-EEQ beim Umsatz mit CYP2J2 der Hauptmetabolit ist, entsteht beim Umsatz mit CYP2C9 v.a. 14,15-EEQ. Interessanterweise besteht zur Regioselektivität dieser Enzyme zusätzlich noch eine Selektivität zur Bildung bestimmter Enantiomere, den R,S-Enantiomeren [90, 91, 94]. Im Gegensatz dazu lässt CYP2C8 aus EPA bevorzugt S,R-Enantiomere entstehen [91, 94].

Im Plasma werden EETs v.a. in *low density*-Lipoproteinen (LDL) transportiert [211], die in der Leber entstehen. Möglicherweise werden auch EEQs und EDPs über LDL

im Plasma transportiert. Das gemessene CYP-Eicosanoidprofil der Probanden konnte keinem Profil eines bestimmten CYP-Enzyms zugeordnet werden. Möglicherweise entsprechen die im Plasma gemessenen CYP-Eicosanoide nicht ausschließlich dem Profil der Neusynthese durch eine bestimmte CYP-Isoform, sondern setzen sich aus verschiedenen Quellen zusammen. Womöglich tragen auch deutliche interindividuelle Unterschiede in der Enzymaktivität zu dem beobachteten Mischeffekt bei. Wie bei vielen Eicosanoiden, geht man bei EETs und wohl auch EEQs und EDPs von lokal wirkenden Mediatoren aus. Deren Präsenz in der Zirkulation jedoch legt auch eine endokrine Funktion dieser Metabolite nahe.

Studien mit rekombinanten CYP-Enzymen zeigen, dass 17,18-EEQ der vorherrschende EPA-Metabolit beim Umsatz mit den humanen CYP-Isoformen CYP1A, CYP2C und CYP2J ist [109]. CYP2J2, das Haupt-CYP-Enzym im menschlichen Herzen, bevorzugt unter den PUFAs EPA als Substrat und metabolisiert EPA mit regio- und stereospezifischer Selektivität hauptsächlich zu dem Epoxymetaboliten 17(R),18(S)-EEQ [91, 111]. Einen weiteren möglichen Anteil an der Metabolisierung von EPA zu 17,18-EEQ könnte die humane CYP-Isoform CYP1A1 haben. Sie ist im Herzen moderat exprimiert [85] und katalysiert die Epoxidation von EPA v.a. an der endständigen Doppelbindung [90, 91, 212], wobei bevorzugt das R,S-Enantiomer von 17,18-EEQ entsteht [212].

Die hier vorgestellte klinische Studie ist mit derzeitigem Kenntnisstand die erste klinische Studie, die systematisch die Veränderungen v.a. im CYP-Eicosanoidprofil nach n-3 PUFA Supplementation zeigt. Trotz der massiven Veränderung der relativen Menge von AA-, EPA- und DHA-abgeleiteten Metaboliten, blieb die generelle Zusammensetzung der verschiedenen regioisomeren Epoxymetabolite innerhalb einer Metabolitenklasse weitestgehend gleich. Dies legt den Schluss nahe, dass die EPA/DHA Supplementation womöglich keinen Einfluss auf das Expressionsmuster der CYP-Enzyme hatte.

Alle EPA- und DHA-abgeleiteten Metabolite stiegen nach acht Wochen Supplementation signifikant an, während bis auf das endständig epoxidierte 14,15-EET alle AA-abgeleiteten Metabolite signifikant reduziert waren. Bei vergleichender Betrachtung der von AA-, EPA- und DHA-abgeleiteten Metabolite, die endständig epoxidiert wurden, fiel auf, dass nach Behandlung 17,18-EEQ der vorherrschende Metabolit im Plasma war, Abbildung 15. 17,18-EEQ stieg im Vergleich zum basalen Wert um das ~3-fache an. Für n-6 PUFA abgeleitete CYP-Eicosanoide (EETs und 20-HETE) ist bekannt, dass sie *in vivo* u.a. in Membranphospholipide nach einer *de novo* Synthese wieder verestert werden [101-

103, 118, 213]. Es ist sogar der Großteil der endogenen CYP-Eicosanoide, die in Membranphospholipiden verestert vorliegen und bis zu 85 % ausmachen können [211]. Neben der *de novo* Synthese stehen CYP-Eicosanoide somit auch als präformierter Pool in Membranphospholipiden zur Verfügung. Als Antwort auf extrazelluläre Stimuli werden PLA<sub>2</sub>-induziert EETs und 20-HETE freigesetzt und aktivieren diverse zelluläre Prozesse. Die hier erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der prinzipielle Mechanismus von Synthese, Speicherung und Freisetzung scheinbar auch auf die von EPA- und DHA-abgeleiteten Epoxy- und Hydroxymetabolite anwendbar ist. Denn der partielle Ersatz von AA durch EPA und DHA in den Membranphospholipiden ging mit einer deutlichen Verschiebung des endogenen CYP-Eicosanoidprofils einher. EETs wurden dabei v.a. durch EEQs und EDPs ersetzt.

In noch höheren Mengen als 17,18-EEQ trat der EPA-Metabolit 5,6-EEQ auf, Abbildung 14. Über die physiologische Bedeutung von 5,6-EEQ ist noch wenig bekannt. 5,6-EET, ein nah verwandter Metabolit, der von AA abgeleitet ist, spielt als vasodilatatorischer Metabolit eine Rolle in Gefäßen [214]. Die Analyse von 5,6-EET birgt aufgrund der labilen Eigenschaften des Metaboliten Probleme. In physiologischen Lösungen und während der Probenaufarbeitung ist 5,6-EET im Gegensatz zu den anderen regioisomeren Epoxymetaboliten von AA, instabil (Halbwertszeit von ~8 Minuten). Unter diesen Bedingungen wandelt sich der Metabolit spontan zu einem  $\delta$ -Lacton um oder hydrolysiert zum korrespondierenden Diol (5,6-DHET) [215]. Es ist denkbar, dass auch 5,6-EEQ ein ähnliches Verhalten zeigt. Die hier gewählten alkalischen Bedingungen für die Aufarbeitung der Metabolite, zeigten sich als vorteilhaft. Sowohl 5,6-EET als auch 5,6-EEQ waren sehr gut nachweisbar.

EETs sind gute Substrate der sEH und werden von dem Enzym zu ihren korrespondierenden Diolen umgesetzt [216]. Experimente aus der AG Schunck haben gezeigt, dass auch EPA- und DHA-Metabolite (17,18-EEQ bzw. 19,20-EDP) gute Substrate für die sEH sind [217], siehe auch [218]. Da die sEH ubiquitär vorhanden ist [219], werden die Epoxymetabolite recht schnell zu ihren korrespondierenden Diolen umgesetzt, die weitgehend unwirksam sind [216]. Die Reduktion biologisch aktiver Epoxymetabolite durch die sEH stellt demnach möglicherweise einen Mechanismus dar, der die Signalstärke der CYP-Epoxyeicosanoide reguliert. Dies wurde bereits für die Modulation von vasokonstriktiven und vasodilatativen Signalen durch die sEH beschrieben, die sich auf den Gefäßwiderstand und Blutdruck im Organismus auswirkte [220].

Da CYP-Eicosanoide an der Regulation von Gefäß-, Nieren- und Herzfunktion beteiligt sind, kann die Verschiebung des endogenen CYP-Eicosanoidprofils weitreichende Konsequenzen hinsichtlich der Entwicklung von kardiovaskulären oder anderen chronischen Erkrankungen haben. Ein Schutz vor Arrhythmien und plötzlichen Herztod ist womöglich der größte Nutzen einer EPA/DHA Supplementation [28, 29]. Frühere Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass in einem Rattenmodell für plötzlichen Herztod die hohe Mortalität und die Induzierbarkeit von Arrhythmien durch die Gabe von zusätzlich 2,5 % Omacor®-Öl zum Standardfutter reduziert werden konnte [16]. In einer weiteren Fütterungsstudie mit Ratten wurde die gleiche EPA/DHA Supplementation verwendet und gezeigt, dass in Herzgewebe und Plasma 17,18-EEQ und 19,20-EDP die vorherrschenden Metabolite waren [109]. Untersuchungen zur physiologischen Funktion dieser Metabolite sind rar. Jedoch gibt es Hinweise, dass EPA- und DHA abgeleitete CYP-Eicosanoide ähnlich den EETs potente Vasodilatoren sind [95, 149-151, 153] und über die Aktivierung von z.B.  $K_{ATP}$ -Kanälen [148] kardioprotektiv wirken.

#### 4.1.2.2 Veränderungen im Profil COX- und LOX-abhängiger Eicosanoide

Neben CYP-Metaboliten wurde für die klinische Studie auch der Gehalt verschiedener COX- und LOX-Metabolite gemessen. Dies erfolgte, um einen Eindruck zu erhalten, welche drei Arme der Arachidonsäure-Kaskade am stärksten auf Veränderungen in der Ernährung bezogen auf das n-6/n-3 Verhältnis reagierte. COX-abhängige Eicosanoide werden im Gegensatz zu den CYP-Eicosanoiden nur sehr vermindert in Membranphospholipide eingebaut und haben zudem eine sehr kurze Halbwertszeit (Sekunden bis Minuten) [118, 119]. Sie stehen damit eher aus einer *de novo* Synthese als aus Membranspeichern zur Verfügung. In den 1970'er Jahren wurde die Hypothese aufgestellt, dass die kardioprotektive Wirkung der n-3 PUFA's über (i) eine vermehrte Synthese von v.a. EPA/DHA abgeleiteten COX- und LOX-Metaboliten, die meist eine verminderte Wirkung oder sogar entgegengesetzte Wirkung zu den AA-Metaboliten aufweisen oder (ii) durch die Inhibierung von COX- und LOX-Enzymen aufgrund erhöhter EPA/DHA-Konzentrationen zu erklären ist (siehe Einleitung Kapitel 1.1).

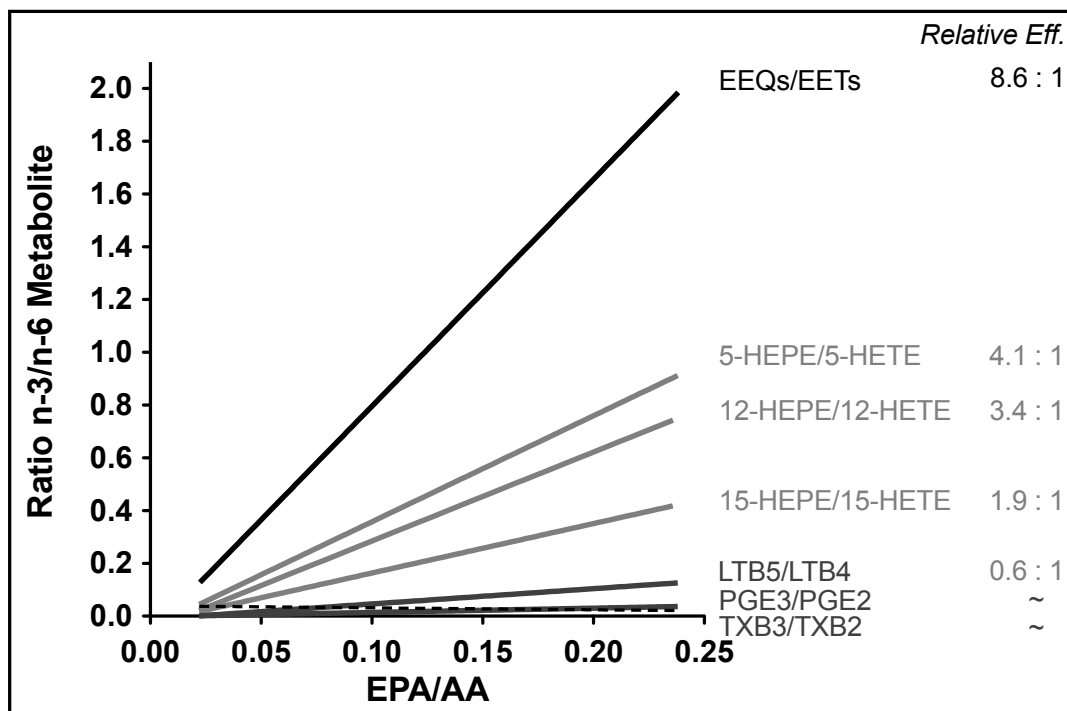
Unter Betrachtung des COX-Eicosanoidprofils fiel auf, dass das von EPA-abgeleitete PGE3 nur leicht, aber signifikant nach EPA/DHA Supplementation anstieg, Abbildung 18 A. PGE2, das von AA-abgeleitet ist, hingegen blieb zwar durch die Behandlung unbeeinflusst, stellte aber mit Abstand den häufigsten Metaboliten dar. Die Metabolite TXB2 und TXB3 hingegen blieben beide durch EPA/DHA Supplementation unbeeinflusst, Abbildung 18 B. Auch hier war der AA abgeleitete Metabolit der

Dominierende. Ähnlich stellt es sich für die 5-LOX-abhängigen Metabolite (Leukotriene und Hydroxymetabolite) dar, Abbildung 19.

Überraschenderweise steht dieser Befund im Widerspruch zu der in den 1970'ern Jahren etablierten Annahme, dass über die Ernährung induzierte Veränderungen im endogenen COX- und LOX-Eicosanoidprofil zu dem maßgeblichen Unterschieden in der Mortalität aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen beitragen. Solche Unterschiede wurden in Bevölkerungsgruppen mit n-6 bzw. n-3 PUFA reicher Ernährung beobachtet [5]. Um ein geringes Auftreten von MIs unter Inuits, die sich hauptsächlich von fettem Fisch ernähren, zu erklären, wurde angenommen, dass EPA mit AA um die Bildung von COX- und LOX- abhängigen Eicosanoiden konkurriert. EPA-abgeleitete Eicosanoide sind durch weniger pro-aggregatorische und pro-inflammatorische Eigenschaften gekennzeichnet. Erste Beispiele waren die Bildung und Funktion des wesentlich weniger potenten Thromboxan A<sub>3</sub> (TXA<sub>3</sub>) versus TXA<sub>2</sub> und von Leukotrien B<sub>5</sub> (LTB<sub>5</sub>) versus LTB<sub>4</sub> [74, 221]. In 2007 durchgeführte Analysen zeigten, dass EPA und AA konkurrierende Substrate in allen Schritten der Prostanoidbiosynthese und auch der Signaltransduktion sind [70]. Wie jedoch die Ergebnisse der klinischen Studie belegen, bleiben die AA-abgeleiteten Eicosanoide trotz EPA/DHA Supplementation die dominierenden Metabolite. Der Einfluss der n-3 PUFA abgeleiteten Eicosanoide kann dabei nur sehr gering sein.

Jüngste Untersuchungen belegen, dass EPA und DHA nicht nur mit AA um die Synthese klassischer COX- und LOX-abhängiger Eicosanoide konkurrieren, sondern auch Vorläufer einer neuen Klasse von potenten anti-inflammatorischen und entzündungsauflösenden Lipidmediatoren darstellen, den Resolvinen, Protectinen und Maresinen [49, 75]. 18-HEPE z.B. ist ein von EPA abgeleiteter Vorläufer der sogenannten E-Resolvine. In der klinischen Studie wurde nach EPA/DHA Supplementation ein signifikanter Anstieg von 18-HEPE im Plasma gemessen. Die Bildung von 18-HEPE scheint von der Verfügbarkeit von EPA abzuhängen, denn mit Absetzen der Medikation sank der 18-HEPE Gehalt wieder auf das Basalniveau.

Um einen direkten Vergleich der relativen Empfindlichkeit der drei Wege der Arachidonsäure-Kaskaden zu Veränderungen im ernährungsbedingten n-3/n-6 PUFA Verhältnisses zu erlangen, wurden die Ratio der Vorläuferfettsäuren (EPA/AA) mit der Ratio der entsprechenden Metabolite (n-3/n-6) korreliert. Wie in Abbildung 52 zu sehen, lag die relative Effizienz des Umsatzes von EPA durch CYP-Enzyme 8,6-fach höher als der Umsatz von AA und stellte damit überraschenderweise die höchste relative Effizienz im Vergleich der verschiedenen Wege der Arachidonsäure-Kaskade dar.



**Abbildung 52: Darstellung der relativen Umsätze aus dem Verhältnis der Vorläuferfettsäuren (EPA/AA) zu den entsprechenden Metaboliten (Ratio n-3/n-6).**

EPA stellt für CYP-Enzyme ein besonders effektives Substrat im Vergleich zu den verschiedenen COX- und LOX-Enzymen dar. Die Metabolite wurden im Plasma gemessen. Zur Auswertung der Daten wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Die angegebenen relativen Effizienzen entsprechen dem Anstieg aus der ermittelten Geradengleichung.

Die relativen Effizienzen des EPA-Umsatzes durch 5-LOX, 12-LOX oder 15-LOX waren deutlich niedriger als der CYP-abhängige Umsatz von EPA und lagen nur noch 4,1-fach, 3,4-fach bzw. 1,9-fach über den AA-Umsatz. Der COX-vermittelte Umsatz von EPA zu Serie-3 Prostaglandinen oder Thromboxanen und der LOX-vermittelte Umsatz zu Serie-5 Leukotrienen scheint jedoch recht ineffizient abzulaufen, da hier der AA-Umsatz scheinbar deutlich effizienter ist. Dies stimmt mit dem Befund überein, dass EPA und DHA eher schlechte Substrate für COX- und LOX-Enzyme sind [70]. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass humane CYP-Enzyme *in vivo* n-3 PUFA als effektive alternative Substrate verwenden und zu biologisch aktiven CYP-Eicosanoiden metabolisieren. Somit sind womöglich nicht die COX- und LOX-abhängigen Metabolite, sondern die n-3 PUFA abgeleiteten CYP-Eicosanoide, die eigentlichen Vermittler der kardioprotektiven Effekte, die den in Fischöl enthaltenden n-3 PUFA zugesprochen werden [8, 27]. Abgeleitet von einer in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Fütterungsstudie mit Ratten [109] ist zu vermuten, dass es nach EPA/DHA Supplementation auch beim Menschen zu einer Verschiebung des endogenen CYP-Eicosanoidprofils im Herzen kommt. Der in der

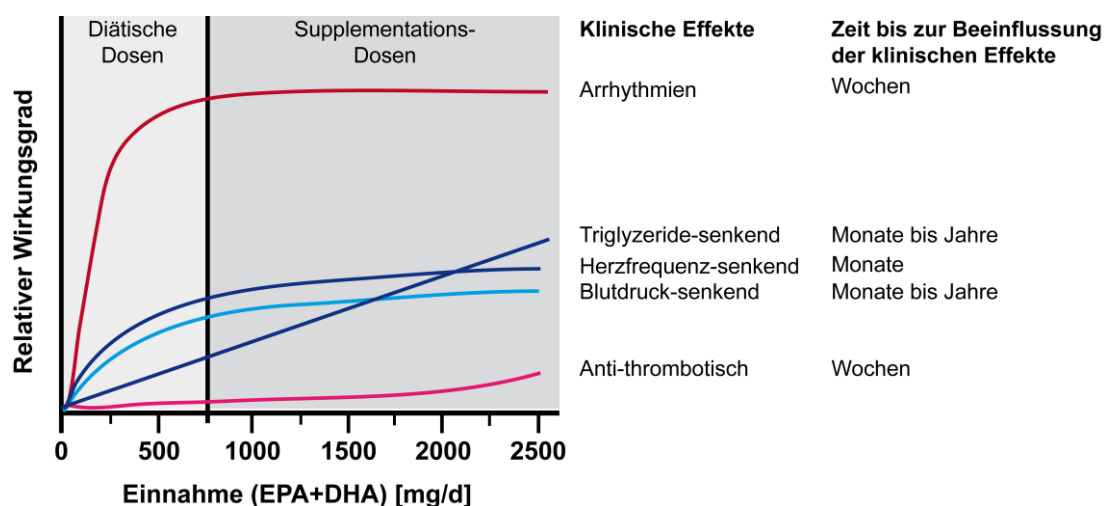


klinischen Studie erreichte Omega-3 Index von  $> 8\%$  entspricht zudem dem Bereich, in dem eine EPA/DHA-Supplementation am effektivsten vor tödlichen Herzrhythmusstörungen schützt.

#### 4.1.2.3 Einfluss der Omacor®-Gabe auf klinische Parameter

n-3 PUFAs beeinflussen eine Reihe von kardiovaskulären Risikofaktoren [7, 8, 45, 64]. Klinisch relevante Effekte treten innerhalb von Wochen der Einnahme auf und sind womöglich Folge von Veränderungen der Membranstruktur, der Genexpression, einer direkten Interaktion mit Ionenkanälen oder Membranproteinen bzw. einer modifizierten Eicosanoidbiosynthese [4, 46-50]. Die Heterogenität der n-3 PUFA vermittelten Effekte auf kardiovaskuläre Ereignisse scheint abhängig von der Dosis und der Dauer der n-3 PUFA Einnahme zu sein und ist sehr wahrscheinlich Ausdruck verschiedener Wirkmechanismen, Abbildung 53.

Bei typischen diätischen Dosen (bis zu 750 mg/d EPA+DHA), dominieren anti-arrhythmische Effekte, wie die Reduktion von plötzlichem Herztod und koronaren Herzerkrankungen. Der anti-arrhythmische Effekt tritt schon nach wenigen Wochen auf und erreicht bei höheren Dosen ein Plateau, Abbildung 53. Andere klinisch relevante Effekte wie z.B. die Triglyzerid-senkende oder möglicherweise auch der anti-aggregatorische Wirkung von n-3 PUFAs gewinnen erst bei höheren Dosen an Bedeutung.



**Abbildung 53: Einfluss der Dosis- und Zeit-abhängigen Einnahme von n-3 PUFAs auf klinische Ereignisse.**

Schema angepasst aus Mozaffarian, D. und Rimm, E.B. (2006) [45].

Interessanterweise konnte in der hier vorgestellten klinischen Studie trotz einer verhältnismäßig geringen Konzentration (1 g EPA+DHA/d für vier Wochen plus 2 g/d

für vier weitere Wochen) und einer geringen Einnahmezeit von insgesamt acht Wochen eine signifikante Reduktion der Triglyzeride beobachtet werden ( $p < 0,01$ ,  $n=19$ ; t-Test für gepaarte Stichproben), Abbildung 22. Die basalen Triglyzeridwerte der gesunden Probanden lagen, außer bei zwei männlichen Teilnehmern, im Normalbereich von  $< 2,3$  mmol/L. Dennoch, Probanden mit einem relativ hohen basalen Triglyzeridwert profitierten am meisten von einer Intervention mit EPA/DHA. Auch zu therapeutischen Zwecken wird sich mittlerweile die Triglyzerid-senkende Wirkung zu Nutze gemacht. So werden derzeit z.B. EPA+DHA-Ethylester (Lovaza™, GlaxoSmithKline) oder nur EPA-Ethylester (Amr101™, Amarin Pharma) erfolgreich zur Behandlung von Hypertriglyzeridämie eingesetzt. Der Triglyzerid-senkende Effekt der n-3 PUFAs beruht einerseits auf einer Reduktion von VLDL-Cholesterol bei gleichzeitiger Erhöhung von HDL-Cholesterol und andererseits auf der Beeinflussung der Lipidmetabolismus-regulierenden Genexpression (Aktivierung von PPAR $\alpha/\gamma$ - und Inhibition von SREBP-1) [4, 48, 194]. Aufgrund des veränderten Genprogramms findet eine Verschiebung des v.a. in der Leber stattfindenden Metabolismus von Lipidsynthese und -speicherung hin zur erhöhten Lipid-degradation ( $\beta$ -Oxidation) statt.

Während die Triglyzerid-senkende Wirkung von n-3 PUFAs linear mit der Dosis ansteigt, scheint die Wirkung n-3 PUFAs auf den Blutdruck eher vom Grad der Schwere des Bluthochdrucks als von der Dosis abzuhängen [222]. Effektive Dosen von n-3 PUFAs schwanken zwischen 3 bis 5 g/d [7], mit denen eine Reduktion des systolischen und diastolischen Blutdruck um ca. 3-5 mmHg bzw. 2-3 mmHg erreicht werden können [223]. Der Blutdruck-senkende Effekt von n-3 PUFAs lässt sich womöglich nur auf die Wirkung von DHA, nicht aber EPA zurückführen [7, 64]. In der hier vorgestellten klinischen Studie können nur Mischeffekte von EPA+DHA beobachtet werden. Die Omacor®-Gabe führte sowohl zu einer Reduktion im systolischen Blutdruck (-1,8 mmHg), als auch zu einer Reduktion im diastolischen Blutdruck (-3,5 mmHg), die nur für den diastolischen Blutdruck als signifikant ermittelt wurde ( $p = 0,036$ ,  $n=19$ ; Wilcoxon Test), Abbildung 21. Möglicherweise war die Gruppengröße von 19 Probanden zu klein, um eindeutige statistische Untersuchungen durchzuführen, denn trotz einer gesunden Probandengruppe traten z.T. größere interindividuelle Unterschiede auf. Eine entsprechende Analyse hat zudem gezeigt, dass Probanden mit einem relativ hohen basalen Blutdruck die größte Reduktion nach EPA/DHA Supplementation aufwiesen.

## **4.2 Anti-arrhythmische Effekte von EPA, 17,18-EEQ und synthetischen Analoga**

### **4.2.1 17,18-EEQ als Vermittler der anti-arrhythmischen Effekte von EPA**

Das von Kang und Leaf etablierte Zellmodell zur Untersuchung anti-arrhythmischer Effekte von EPA und DHA auf NRKMs [21, 28] wurde in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung von EPA, 17,18-EEQ und davon abgeleiteten synthetischen Analoga verwendet. Übereinstimmend mit den Daten aus der Literatur zeigte EPA auch in unserem Bioassay eine Reduktion der Schlagfrequenz. Diese Reduktion wurde sowohl unter Basalbedingungen als auch unter Bedingungen mit steigender Kalzium-Konzentration beobachtet. Ähnlich wie EPA zeigte 17,18-EEQ einen negativ chronotropen Effekt auf NRKMs und schützte ebenfalls vor einer Überladung mit Kalzium, Abbildung 23. Im Vergleich zu EPA wurde 17,18-EEQ bereits nach einer kurzen Inkubationszeit (5 min vs. 30 min) und mit einer Konzentration im nanomolaren Bereich (30 nM vs. 3,3  $\mu$ M) wirksam. Das 17,18-EEQ akut und bereits im nanomolaren Bereich wirkt, legt den Schluss nahe, dass EPA eine vorausgehende CYP-abhängige Metabolisierung benötigt, um den beobachteten negativ chronotropen Effekt auf NRKMs auszuüben.

Weiterhin wurde gezeigt, dass 17,18-EEQ die Antwort auf eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol reduzierte, Abbildung 24. Als synthetisches Katecholamin wirkt Isoproterenol über die Aktivierung  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren, die zur Familie der GPCRs gehören und an Gas-Proteine gekoppelt sind. Über die anschließende Aktivierung der Adenylatzyklase wird die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht und die PKA aktiviert, was u.a. über die Öffnung von L-Typ Kalzium-Kanälen zu einer erhöhten Kontraktilität von Kardiomyozyten führt [224]. Eine Reduktion der  $\beta$ -adrenergen Antwort könnte auf eine 17,18-EEQ vermittelte Aktivierung von G $\alpha$ i-Proteinen hindeuten, die eine Inhibition der Adenylatzyklase-Aktivität und eine damit einhergehenden reduzierte intrazelluläre cAMP-Konzentration zur Folge hat (siehe auch Hypthesenschema: Abbildung 56).

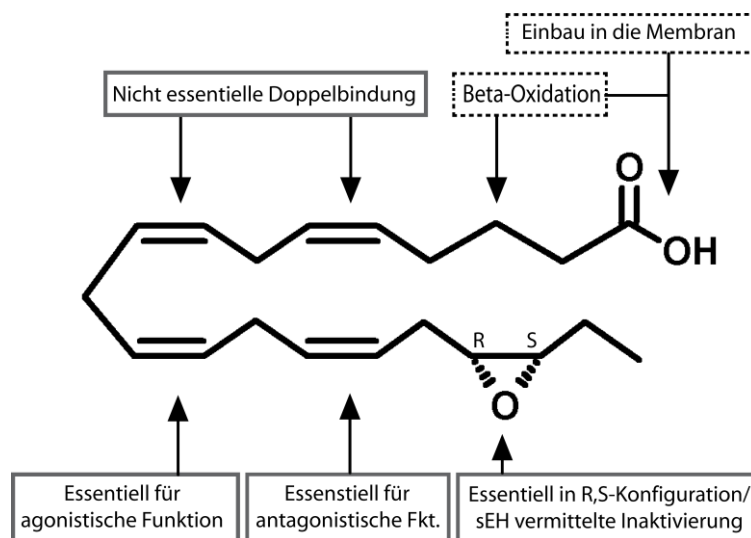
Die in NRKMs befindlichen CYP-Enzyme sind noch unbekannt. Untersuchungen mit rekombinanten CYP-Isoformen zeigten, dass 17,18-EEQ der bevorzugte Metabolit von EPA ist und aus einer Katalyse von EPA durch verschiedene CYP-Isoformen der CYP1A, CYP2C und CYP2J Unterfamilien hervorgeht [109]. CYP2J2 metabolisiert, wie oben beschrieben, EPA mit regio- und stereospezifischer Selektivität hauptsächlich zu 17(R),18(S)-EEQ [91, 111]. Im Rattenherzen gibt es eine nah verwandte CYP-Isoform (CYP2J3 [125]), die in NRKMs für die Metabolisierung von 17,18-EEQ verantwortlich sein könnte. Eine andere CYP-Isoform (CYP1A1) scheint

keine Rolle zu spielen, da es nicht wie beim Menschen konstitutiv im kardiovaskulärem System exprimiert wird [85]. Wie in einer Fütterungsstudie gezeigt, entstand auch *in vivo* 17,18-EEQ, das sich nach EPA/DHA-Supplementation im Herzgewebe der Ratte anreicherte [109].

#### 4.2.2 Identifikation struktureller Voraussetzungen für die 17,18-EEQ Wirkung

Trotz einer möglichen wichtigen Rolle von n-3 PUFA abgeleiteten CYP-Eicosanoiden, wie 17,18-EEQ und 19,20-EDP, in der Vermittlung kardioprotektiver Effekte, werden sie nicht therapeutisch genutzt. Ursache dafür ist eine limitierte Bioverfügbarkeit und die chemische sowie metabolische Instabilität dieser Substanzen. Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit John R. Falck (UT Southwestern, Dallas, Texas) erhielten wir gezielt modifizierte Strukturen von 17,18-EEQ zur Testung auf NRKMs. Die Stärke des chronotropen Effekts wurde dabei als Maß für das „anti-arrhythmische Potential“ der Strukturanaloga verwendet.

Abbildung 54 zeigt eine graphische Zusammenfassung der Strukturfunktionsanalyse von 17,18-EEQ. Gekennzeichnet sind u.a. strukturelle Merkmale, die essentiell für den negativ chronotropen Effekt von 17,18-EEQ auf NRKMs von Bedeutung sind. Zusätzlich sind weitere Angriffspunkte gezeigt, die zur Instabilität des Metaboliten beitragen können.

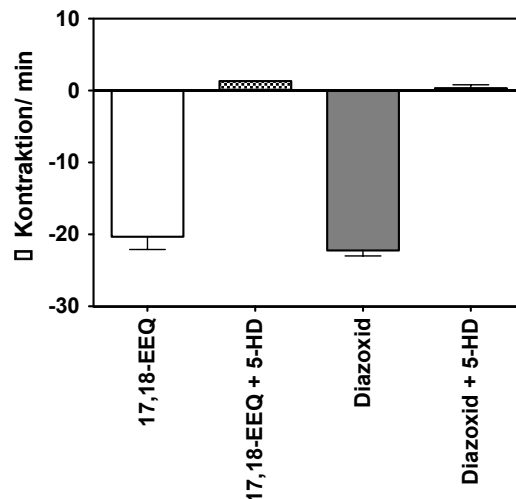


**Abbildung 54: Zusammenfassende Darstellung der Strukturfunktionsanalyse.**

Essentiell für die agonistische Funktion von 17,18-EEQ sind eine Carboxylgruppe am C1-Atom, eine Doppelbindung in 11,12-Position und eine Epoxygruppe in 17,18-Position und R,S-Konfiguration. Angepasste Graphik aus J.R. Falck et al., JMC 2011 [180].

Die **Stereochemie** der 17,18-Epoxygruppe spielt für die Funktion von 17,18-EEQ eine wichtige Rolle. Untersuchungen mit NRKMs zeigten, dass nur das 17(R),18(S)-Enantiomer den gleichen negativ chronotropen Effekt wie das Racemat ausübte. Das

17(S),18(R)-Enantiomer hingegen blieb unwirksam, Abbildung 26. Dieser Befund bestätigte sich in der Testung verschiedener 17,18-EEQ Strukturanaloga, bei denen ebenfalls nur das 17(R),18(S)-Enantiomer wirksam war. Neben dem antiarrhythmischen Potential von 17(R),18(S)-EEQ auf NRKMs, ist die stereospezifische Wirkung in Gefäßen untersucht worden. In Ratten-Cerebralarterien fungierte 17(R),18(S)-EEQ als potenter Aktivator von BK-Kanälen und wirkte so vasodilatatorisch [95]. Interessanterweise blieb auch hier das 17(S),18(R)-Enantiomer unwirksam. Darüberhinaus, könnte 17(R),18(S)-EEQ möglicherweise auch ein potenter Aktivator von kardialen  $K_{ATP}$ -Kanälen sein, die eine besondere Rolle in der ischämischen Vorkonditionierung spielen [225, 226]. Untersuchungen dazu gibt es noch nicht, aber für kardiale sarkolemmale  $K_{ATP}$ -Kanäle konnte eine stereospezifische Aktivierung gezeigt werden. Getestet wurde dies mit dem AA-abgeleiteten Metaboliten 11,12-EET, wobei nur das 11(S),12(R)-Enantiomer aktiv war [148]. Überraschenderweise zeigten entsprechende EPA- und DHA-abgeleiteten Metabolite, die als Razemate getestet wurden, sogar ein deutlich höheres Potential sarkolemmale  $K_{ATP}$ -Kanäle zu aktivieren als die von AA-abgeleiteten EETs [148]. Neben dem sarkolemmalen  $K_{ATP}$ -Kanal spielt v.a auch der mitochondriale  $K_{ATP}$ -Kanal ( $mK_{ATP}$ -Kanal) eine wichtige Rolle in kardioprotektiven Ereignissen wie ischämischer Vorkonditionierung. Mit Hilfe eines für den  $mK_{ATP}$ -Kanal spezifischen Kanalöffners (Diazoxid) oder Kanalblockers (5-HD, *5-hydroxydeconate*) konnte in verschiedenen Zellmodellen gezeigt werden, dass der  $mK_{ATP}$ -Kanal tatsächlich die Vorkonditionierung in Kardiomyozyten vermittelt [225, 227]. Einen Hinweis auf die Beteiligung von  $mK_{ATP}$ -Kanälen in der 17,18-EEQ vermittelten Signaltransduktion, lieferte ein Vorversuch in unserem Bioassay mit Diazoxid, Abbildung 55. Diazoxid übte den gleichen negativ chronotropen Effekt wie der natürliche Metabolit 17,18-EEQ aus. Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von 5-HD aufgehoben.



**Abbildung 55: Die Öffnung von  $K_{ATP}$ -Kanälen ist Teil der 17,18-EEQ vermittelten Signaltransduktion.**

Der  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner Diazoxid zeigte den gleichen negativ chronotropen Effekt wie 17,18-EEQ, der sich durch den Inhibitor 5-HD blockieren ließ. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 2 Präparationen (n=12).

Eine weitere Modifikation der 17,18-EEQ-Struktur beinhaltete die partielle Sättigung von **Doppelbindungen**. Doppelbindungen (DB) innerhalb der Struktur sind mögliche Orte von Autoxidation oder können als Angriffspunkt für COX- oder LOX-Enzyme dienen [180, 228]. Die Strukturfunktionsanalyse mit einer Serie von mehr als 25 synthetischen Analoga zeigte, dass eine DB in 11,12-Position und *cis*-Konfiguration Voraussetzungen für eine agonistische Wirkung waren, Abbildung 54. Mit Hilfe von Strukturanaloga, die entweder eine DB in *trans*-Konfiguration oder eine Dreifachbindung in 11,12-Position aufwiesen, konnte bestätigt werden, dass nur Analoga mit *cis*-DB biologisch aktiv waren. Analoga mit einer Doppelbindung in 14,15-Position hingegen antagonisierten den EPA- und 17,18-EEQ-Effekt. DBs in 8,9- und 5,6-Position scheinen keine essentielle Rolle in der Vermittlung des 17,18-EEQ Effekts zu spielen. Dies deutet darauf hin, dass die 11,12-DB in *cis*-Konfiguration maßgeblich zum negativ chronotropen Effekt von 17,18-EEQ auf NRKMs beiträgt.

Die **Hydroxylierung** des endständigen C-Atoms (C20) ist Teil des gewöhnlichen Abbauwegs von FS und Eicosanoiden [229]. Nicht überraschend zeigte die Untersuchung entsprechender Analoga im Bioassay eine deutliche Verschlechterung der biologischen Aktivität.

Die **Epoxygruppe** innerhalb des Moleküls ist möglicher Angriffspunkt für eine enzymatische Hydrolyse mittels sEH. Die sEH ist ubiquitär vorhanden und spielt im Abbau von CYP-Epoxyeicosanoiden eine große Rolle [220]. AA-abgeleitete CYP-Epoxyeicoasnoide (EETs) sind nach sEH-Umsatz zum korrespondierenden Diol

meist unwirksam, insbesondere hinsichtlich ihrer vasodilatorischen Funktion [113, 230]. Auch 17,18-DHEQ, das korrespondierende Diol zu 17,18-EEQ, konnte die Schlagfrequenz der NRKMs nicht reduzieren. Nicht nur CYP-Enzyme, sondern auch die sEH zeigen eine Regio- und Stereoselektivität in der Effizienz beim Abbau verschiedener Epoxyeicosanoide [114, 115]. Daten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass sowohl 17,18-EEQ als auch 19,20-EDP mit hoher Stereoselektivität hydrolysiert werden [217]. Das R,S-Enantiomer beider Metabolite war gegenüber dem S,R-Enantiomer das bevorzugte Substrat, welches mit höherer katalytischer Aktivität von der sEH hydrolysiert wurde. Um den Abbau mit sEH zu entgehen und einen stabilen Metaboliten für mögliche *in vivo* Anwendungen zu generieren, wurde die Epoxygruppe an 17,18-Position durch stabilere Epoxid-Derivate (Harnstoffderivat oder Oxamid) ersetzt. Prinzipiell konnte die biologische Aktivität von 17,18-EEQ mit den Epoxybioisosteren reproduziert werden. Das Oxamid-Derivat übte sogar einen stärkeren Effekt auf NRKMs als der natürliche Metabolit aus. Die absolute Konfiguration der Epoxygruppe scheint dem Einfluss der Position der Doppelbindung auf die Wirkung der Strukturanaloga übergeordnet zu sein. Denn wie Analog 11 zeigte, war es, trotz einer Doppelbindung in 14,15- statt 11,12-Position, als R,S-Enantiomer wirksam.

Um zu zeigen, dass die oben beschriebenen chemischen Veränderungen der 17,18-EEQ-Struktur zu einer verbesserten metabolischen Stabilität führten, wurden ausgewählte Strukturanaloga mit Rattenleber-Homogenaten untersucht [180]. So konnte z.B. gezeigt werden, dass das am besten wirksamste Epoxybioisoster (Analog 17) nach 30 min noch zu 85 % vorhanden war, während der natürliche Metabolit in der gleichen Zeit schon zu 80 % metabolisiert war.

Hier nicht näher untersucht, aber auch ein möglicher Angriffspunkt in der 17,18-EEQ Struktur ist die **Carboxylgruppe**. Die Carboxylgruppe ist Ausgang für eine mögliche Veresterung des Metaboliten in Membranphospholipiden oder den Abbau über  $\beta$ -Oxidation. Durch den Ersatz der Carboxylgruppe mit reversiblen oder irreversiblen Gruppen, könnte die Stabilität weiter gesteigert werden.

Ähnliche Studien zur Struktur-Wirkungsbeziehung wurden bereits mit dem AA-abgeleiteten Metaboliten 14,15-EET durchgeführt [230-233]. Untersucht wurde die vasodilatorische Funktion von 14,15-EET Strukturanaloga in Koronararterien vom Rind. Für eine volle Funktion waren eine Carboxylgruppe am ersten C-Atom, eine DB in 8,9-Position, eine Gesamtlänge des Moleküls von 20 C-Atomen und ein 14(S),15(R)-Epoxid in *cis*-Konfiguration notwendig. Die Ergebnisse aus dieser Studie und aus der hier vorgestellten Struktur funktionsanalyse zeigen, dass die Funktion der

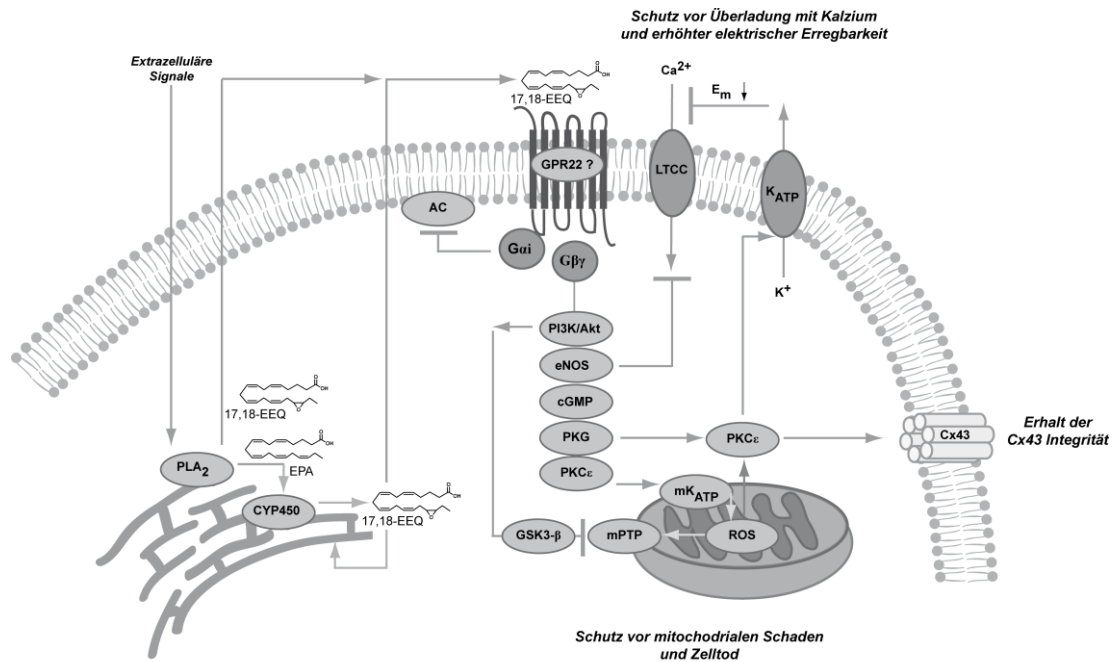
CYP-Epoxyeicosanoide im biologischen System strikten strukturellen Voraussetzungen unterliegt und möglicherweise über ein primäres zelluläres Ziel, einen Rezeptor, vermittelt wird. Weitere Argumente für eine Rezeptorvermittelte 17,18-Wirkung sind (i) die Beobachtung, dass der natürliche Metabolit 17,18-EEQ und die davon abgeleiteten Strukturanaloga bereits im nanomolaren Bereich hoch wirksam sind. Aktuelle Untersuchungen ergaben für 17,18-EEQ einen  $EC_{50}$  Wert von  $\sim 7,3$  nM. (ii) 17,18-EEQ und ein ausgewähltes Struktur analog (Analog 17) zeigten das gleiche Inhibitorprofil wie EPA. Das heißt, dass alle drei Substanzen den gleichen Signaltransduktionsweg anstoßen, Abbildung 27.

### 4.3 Identifizierung eines 17,18-EEQ Rezeptors

#### 4.3.1 Suche eines potentiellen Rezeptorkandidaten

Die primären zellulären Ziele von CYP-Epoxyeicosanoiden sind bislang noch unbekannt, schließen aber intrazelluläre Ziele mit niedriger Affinität, wie Proteine der PPAR-Familie [234], Ionenkanäle (z.B.  $K_{ATP}$ -Kanäle) [144] oder hoch affine, membrangebundene Rezeptoren wie GPCRs [6, 155, 235] mit ein. Kürzlich durchgeführte Untersuchungen in verschiedenen Laboren unterstützen die Hypothese, dass CYP-Eicosanoide intrazelluläre Signalwege über die Aktivierung von GPCRs anstoßen, wobei die Identität dieser GPCRs weiterhin unbekannt ist. Der vasodilatorische Effekt von AA-abgeleiteten EETs ist womöglich über einen oder mehrere Gas-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt [155, 156, 235]. Die Bindung von EETs an einen möglichen Rezeptor aktiviert die Adenylatcyclase, was zu einem Anstieg des intrazellulären  $Ca^{2+}$  und einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und letztlich zu einer verminderten Rezeptorexpression führt [236, 237]. Ein weiterer Hinweis auf einen GPCR-vermittelten Mechanismus wurde dadurch geliefert, dass 11,12-EET sowohl  $BK_{Ca}$ -Kanäle als auch „tissue plasminogen activator“ (tPA) über Gas-Proteine aktivierte [157, 216, 238, 239]. Auch die 11,12-EET vermittelte Erhöhung des intrazellulären cAMPs in Kardiomyozyten läuft womöglich über die Aktivierung von Gas-Proteinen ab [145] Im Gegensatz dazu sind die kardioprotektiven Effekte von 17,18-EEQ und dessen synthetischen Analoga womöglich eher über Gai-Protein gekoppelte Rezeptoren, wie sie während ischämischer oder chemischer Vorkonditionierung aktiviert werden, zu erklären, Abbildung 56.





**Abbildung 56: Hypothesenschema zum möglichen molekularen Mechanismus der 17,18-EEQ Wirkung in Kardiomyozyten.**

Durch externe Stimuli wie ischämischen Stress wird Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) aktiviert, die EPA oder 17,18-EEQ aus Membranphospholipiden freisetzt. Extrazellulär bindet 17,18-EEQ womöglich an einen Gαi-Protein gekoppelten Rezeptor und stößt damit eine Signalkaskade an, die ähnlich dem „reperfusion injury salvage kinase“ (RISK)-Signalweg ist. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Aktivierung der Protein Kinase C epsilon (PKCε), die einmal auf mitochondriale ATP sensitive Kaliumkanäle (mK<sub>ATP</sub>) wirkt und damit vor einen durch Mitochondrien induzierten Zelltod schützt. Zum Anderen wirkt die PKCε auf sarkolemmale K<sub>ATP</sub>-Kanäle (K<sub>ATP</sub>) als auch auf Connexin 43 (Cx43), wodurch die elektrische Erregbarkeit der Zelle reduziert wird und die Funktion der Cx43 zur gerichteten Weiterleitung von Aktionspotentialen erhalten bleibt. AC = Adenylatcyclase, CYP450 = Cytochrome P450, eNOS = endotheliale NO-Synthase, cGMP = cyclisches Guanosinmonophosphat, PKG = Proteinkinase G, GSK3-β = Glykogen Synthase Kinase 3 β, mPTP = *mitochondrial permeability transition pore*, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, Cx43 = Connexin43, LTCC = L-Type Calcium Kanal.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden NRKMs mit Pertussistoxin, welches Gαi-Proteine inaktiviert, vorinkubiert. Eine Behandlung der Zellen mit Pertussistoxin führte tatsächlich zu einer Aufhebung des negativ chronotropen Effekts von 17,18-EEQ, Abbildung 28. Dies deutet darauf hin, dass Gαi-Protein gekoppelte Rezeptoren Teil der 17,18-EEQ vermittelten Signaltransduktion sind. Da die molekulare Identität eines solchen Rezeptors noch unbekannt ist, wurden Anstrengungen unternommen einen möglichen Rezeptorkandidaten zu identifizieren.

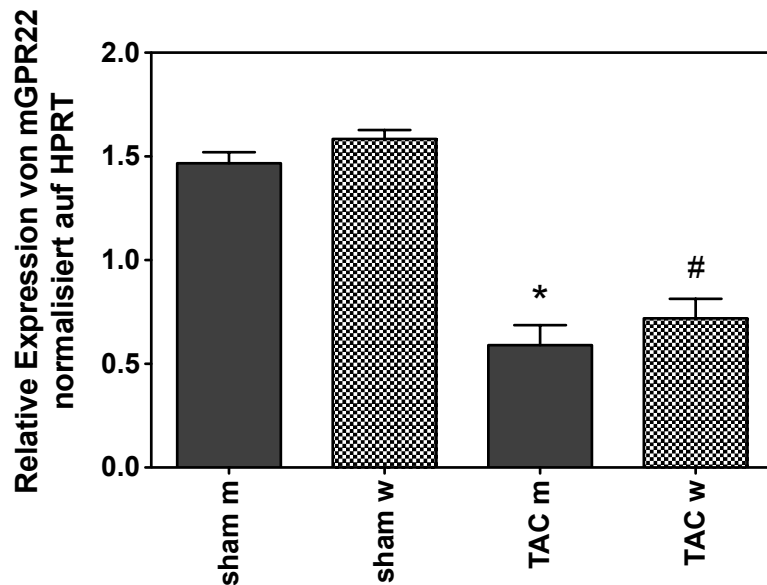
Rund 36 % der auf dem Markt befindlichen Medikamente sind gegen GPCRs gerichtet [240]. Sie sind damit die am häufigsten angewendete Zielgruppe für die Medikamentenentwicklung. Damit verbunden ist ein enormes Potential für die Suche nach neuen Rezeptoren für CYP-Eicosanoide, v.a. unter den *orphan* GPCRs, deren

natürlicher Ligand noch unbekannt ist. Daher wurde die Suche nach einem geeigneten Rezeptorkandidaten ausschließlich auf *orphan* GPCRs beschränkt. Aus einer Liste von potentiellen *orphan* GPCRs als Kandidaten wurde GPR22 ausgewählt, da er eine Reihe von Kriterien als möglicher 17,18-EEQ-Rezeptor erfüllte. GPR22 gehört zur Rhodopsin-Familie der GPCRs, zu der auch Rezeptoren gehören, die freie Fettsäuren, Prostaglandine und Leukotriene binden [160]. Neben einer Expression von GPR22 im Gehirn [183], wurde eine Expression des Rezeptors v.a. im humanen sowie murinen Herzen nachgewiesen [184, 185]. Eigene Untersuchungen verschiedener Gewebe der Ratte und humaner Gewebeproben zeigten eine GPR22-Expression v.a. im Herzen, Gehirn und in der Lunge, Abbildung 30 und Abbildung 31. Dies sind Gewebe, die von einer schützenden Funktion der n-3 PUFAs oder 17,18-EEQ profitieren. Von Bedeutung für die Interpretation der Ergebnisse aus dem Bioassay war der Befund, dass GPR22 auch in NRKMs exprimiert ist, Abbildung 32.

Wie oben beschrieben, scheinen Gai-Protein gekoppelte Rezeptoren an der Vermittlung des 17,18-EEQ Effekts beteiligt zu sein. Interessanterweise wurde von Adams et al. für GPR22 eine Kopplung an Gai-Proteine beschrieben [185]. Zur Überprüfung der funktionellen Rolle von GPR22 in NRKMs wurden diese mit siRNA oder *antisense* Oligonukleotiden behandelt, die gegen GPR22 gerichtet waren. Eine verminderte Expression des Rezeptors führte tatsächlich zu einer Aufhebung des 17,18-EEQ Effekts, was die Bedeutung von GPR22 als potentiellen Rezeptorkandidaten in NRKMs unterstreicht.

#### **4.3.2 Mögliche physiologische Bedeutung von GPR22 im kardiovaskulären System**

Über die physiologische Bedeutung von GPR22 ist noch wenig bekannt, jedoch wurde von Adams et al. beschrieben, dass GPR22 bei kardialer Hypertrophie vermindert exprimiert ist [185]. Während die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie in WT und GPR22-KO Mäusen gleich war, war die Herzkontraktilität nach chronischer Druckbelastung (*transverse aortic constriction*, TAC) in GPR22-KO Mäusen signifikant verschlechtert. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe mit C57BL/6 Mäusen zeigten ebenfalls, dass eine verschlechterte Herzfunktion nach TAC (Abbildung 1 in [132]) mit einer verminderten GPR22-Expression einherging, Abbildung 57.



**Abbildung 57: Die GPR22-Expression ist bei Herzhypertrophie reduziert.**

Gezeigt ist die Expression in männlichen (m) und weiblichen (w) C57BL/6 Wildtyp (WT)-Tieren, die entweder einer Scheinoperation (sham) oder einer Operation mit transverser Aortenkonstriktion (TAC) unterzogen wurden (n=8-10 pro Gruppe). Die Tiere wurden 8 Wochen nach der Operation getötet und Gewebe des linken Ventrikels für die mRNA-Analyse aufgearbeitet. Die Daten zur GPR22-Expression wurden mittels qRT-PCR erhoben. Das Gewebe stammt von Tieren einer Versuchsreihe, die von Westphal et al. 2013 veröffentlicht wurde [132].

In der eigenen Arbeitsgruppe wurden Untersuchungen zum Einfluss einer erhöhten endogenen EET-Biosynthese auf das kardiovaskuläre System vorgenommen. Dazu wurden transgene Tiere verwendet, die Kardiomyozyten-spezifisch die humane CYP-Epoxygenase CYP2J2 exprimieren [132]. Die Studie zeigte, dass die erhöhte CYP2J2-Expression in zwei Modellen der Herzhypertrophie vor Arrhythmie neigung schützte, wie z.B. vor der Neigung zu ventrikulären Arrhythmien nach chronischer Druckbelastung (TAC). Dies ließ sich v.a. auf eine verbesserte elektrophysiologische Funktion des Herzens zurückführen. Ergebnisse der Studie lassen vermuten, dass CYP2J2-abgeleitete Metabolite wie EETs, EEQs oder EDPs eine wichtige Rolle in der Regulation der Integrität von *gap junction* Proteinen, wie dem Cx43, spielen. Cx43-Proteine leiten elektrische Signale von einer Zelle zur nächsten schnell weiter und tragen somit zur gerichteten Übertragung des Aktionspotentials im Herzen bei [241]. Eine durch Hypertrophie-induzierte Dislokalisierung von Cx43, wie sie in den WT-Tieren, aber nicht in den CYP2J2 TG zu beobachten war, führte zu andauernden Arrhythmien [132].

Möglicherweise ist der schützende Effekt von EETs zusätzlich mit der Kapazität der EETs verbunden  $mK_{ATP}$ -Kanäle zu aktivieren. Bei Zugabe exogener EETs wurde in Kardiomyozyten von CYP2J2 transgenen Tieren eine erhöhte Aktivität der  $mK_{ATP}$ -

Kanäle im Vergleich zu Kardiomyozyten aus WT-Tieren beobachtet [122]. Es ist denkbar, dass CYP-abhängige Epoxymetabolite, die von n-3 PUFAs abgeleitet sind, womöglich wesentlich potentere Substanzen darstellen als die EETs. n-3 PUFAs sind sehr effektive alternative Substrate, die von CYP2J2 gegenüber der n-6 PUFA AA sogar bevorzugt zu entsprechenden Epoxyeicosanoiden umgesetzt werden (s.o.). Bezogen auf die Kapazität  $K_{ATP}$ -Kanäle in Kardiomyozyten zu öffnen, sind EEQs und EDPs deutlich effektiver als EETs [148]. Wie oben bereits beschrieben, scheint auch der negativ chronotrope Effekt in NRKMs von 17,18-EEQ über die Öffnung von  $mK_{ATP}$ -Kanälen vermittelt zu sein, Abbildung 55.

Über die Wirkung von EEQs und EDPs auf die Integrität von Cx43-Proteinen im Herzen gibt es noch keine Untersuchungen. Aber in einem Modell für Angiotensin II induzierte kardiale Schäden, konnte gezeigt werden, dass eine EPA/DHA-Supplementation die Dislokation von Cx43-Proteinen verhinderte [16]. In einem Rattenmodell für essentielle Hypertonie konnte kürzlich gezeigt werden, dass n-3 PUFAs vor ventrikulären Arrhythmien schützten und halfen den Sinusrhythmus wieder herzustellen [242]. In diesem Modell trugen ebenfalls eine Verbesserung der Cx43-Integrität, aber auch das Auslösen PKC-vermittelter Signalkaskaden und ein normalisiertes Profil der schweren Myosinkette entscheidend zur anti-arrhythmischen Wirkung der n-3 PUFAs bei. Wenn man davon ausgeht, dass die CYP-Epoxymetabolite die eigentlichen Vermittler der n-3 PUFA Effekte sind, dann schützen womöglich auch EPA- und DHA-abgeleitete CYP-Metabolite wie 17,18-EEQ und 19,20-EDP vor einer Dislokation von Cx43-Proteinen bei Herzhypertrophie, siehe auch Abbildung 56.

Sowohl  $mK_{ATP}$ -Kanäle als auch Cx43-Proteine werden von der  $PKC\epsilon$  aktiviert [243]. Die  $PKC\epsilon$  kann sowohl zytosolisch als auch mitochondrial vorliegen [244]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zur Reduktion eines Infarktschadens durch EET-Gabe hat gezeigt, dass sowohl die eNOS als auch  $mK_{ATP}$ -Kanäle und mPTPs eine Rolle in der Vermittlung der schützenden EET-Funktion hatten [245]. Eine zentrale Rolle der Effektvermittlung könnte dabei die  $PKC\epsilon$  einnehmen. In Übereinstimmung mit den Daten zum Inhibitorprofil in NRKMs, lösen die vom aktivierten GPCR freigesetzten  $G\beta/\gamma$ -Untereinheiten eine Signalkaskade aus, die von einer  $PKC\epsilon$ -Aktivierung und der Öffnung von  $K_{ATP}$ -Kanälen abhängig ist, Abbildung 27 und Abbildung 55.  $PKC\epsilon$  und  $K_{ATP}$ -Kanäle sind als wichtige Komponenten kardioprotektiver Mechanismen wie sie z.B. bei ischämischer Vorkonditionierung auftreten bekannt [225, 226, 243, 246]. Daher könnte man vermuten, dass n-3 PUFAs und ihre abgeleiteten CYP-Metabolite im wesentlichen den gleichen Signalweg nutzen, um anti-arrhythmisch zu wirken. Ischämie-induziert werden sowohl EETs als auch 20-HETE aus

Membranphospholipiden freigesetzt [138]. Analog dazu werden womöglich auch entsprechende von EPA- und DHA-abgeleitete CYP-Metabolite freigesetzt, die kardioprotektive Signalwege initiieren. Somit hängt es vom Metabolitenprofil in den Plasmamembranen ab, welche Signalwege letztlich bei ischämischen Stress angestoßen werden.

#### 4.3.3 Erste Schritte zur Validierung der Rezeptorfunktion

Zur Überprüfung der GPR22 Funktion wurde der humane Rezeptor in zwei verschiedenen Zellsystemen heterolog exprimiert. Für die Expression wurden Sf9-Insektenzellen und humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) verwendet. Die Expression der endogenen Sequenz gelang zunächst nicht. Eine Analyse der cDNA-Sequenz ergab, dass GPR22 keine Signalsequenz enthält und AT-reich ist, was möglicherweise aufgrund einer instabilen mRNA einen Einfluss auf die Expression hat. GPR22 gehört zu den GPCRs und damit zu den 7-transmembranspannenden Rezeptoren. Der erste Schritt im intrazellulären Transport des Proteins ist der Einbau in die ER-Membran [247]. Signalsequenzen unterstützen die initiale Faltung des Proteins während der Proteinbiosynthese im ER und definieren den Bestimmungsort des Proteins [248]. Aus diesem Grund wurde zur Verbesserung der Proteinexpression N-terminal eine Signalsequenz (Melittin-Signalsequenz von der Honigbiene) an die GPR22-Sequenz angefügt. Eine ähnliche Strategie wurde bereits für die heterologe Expression des Dopaminrezeptors beschrieben [249]. Zusätzlich wurde die endogene Sequenz Codon-optimiert, um eine verbesserte Translation sowie erhöhte Stabilität der GPR22-mRNA zu erreichen. Zum Schluss wurde an der optimierten GPR22-Sequenz C-terminal noch eine Erkennungssequenz (6x HisTag) angefügt, was eine Unterscheidung des heterolog exprimierten Proteins vom endogenen Protein ermöglichte.

Nach oben beschriebener Optimierung gelang eine Expression in sowohl Insektenzellen (Abbildung 45) als auch HEK293-Zellen (Abbildung 49). Als 7-transmembranspannendes Protein wäre die Lokalisation von GPR22 als reifes Protein in der Plasmamembran zu erwarten. Eine Kofärbung von sowohl dem Rezeptor als auch der Plasmamembran zeigte in HEK293-Zellen eine Kolo-kalisation, Abbildung 50. Damit schien der heterolog exprimierte Rezeptor tatsächlich in ausreichender Menge in der Plasmamembran vorhanden zu sein. Dies war Voraussetzung für weitere Experimente zur Verifizierung des Rezeptors.

Die heterolog exprimierenden Zellen wurden zur Untersuchung der Ligandenspezifität von GPR22 verwendet. Dazu wurden erste Bindungsversuche mit [<sup>3</sup>H]-markiertem

14,15-EET durchgeführt. Ziel der Bindungstests war die Klärung der Fragen ob (i) GPR22-exprimierende Zellen mehr Epoxymetabolit ( $[^3\text{H}]$ -14,15-EET) binden würden als die Kontrollzellen, (ii) ob die Bindung spezifisch und/oder reversibel ist und (iii) ob die Bindung stereospezifisch ist. Im kompetitiven Versuchsaufbau wurde der vermeintlich endogene Ligand von GPR22, 17,18-EEQ, zur Verdrängung des  $[^3\text{H}]$ -markierten Liganden eingesetzt. 14,15-EET bindet wegen seiner ähnlichen Struktur zu 17,18-EEQ womöglich auch an GPR22, stellt aber wahrscheinlich nicht den endogenen Hauptliganden dar, der eine G $\alpha$ i Protein vermittelte Signaltransduktion anstößt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass die heterolog exprimierenden Sf9-Zellen tatsächlich mehr  $[^3\text{H}]$ -markierten Liganden gebunden hatten als die entsprechenden Kontrollzellen. Die Bindung von  $[^3\text{H}]$ -14,15-EET schien in Sf9-Zellen abhängig vom Stereoisomer zu sein, denn sowohl die Kontrollzellen als auch die GPR22 exprimierenden Zellen hatten mehr S,R-Enantiomer als R,S-Enantiomer gebunden, Tabelle 14. Interessanterweise ist es auch das 14(S),15(R)-EET, das auf NRKMs einen negativ chronotropen Effekt ausübte und nicht das R,S-Enantiomer (Daten nicht gezeigt). Eine stereospezifische Bindung von  $[^3\text{H}]$ -14,15-EET ist bereits von Wong et al. beschrieben worden [68]. Erstaunlicherweise war es hier das 14(R),15(S)-Enantiomer, welches mit einer  $K_d$  von 5,7 nM an die Membran gebunden hatte und den  $[^3\text{H}]$ -markierten, razemischen Liganden wesentlich effektiver als das 14(S),15(R)-Enantiomer verdrängte. Für die Untersuchungen von Wong et al. wurden mononukleäre Zellen verwendet. Möglicherweise weisen diese Zellen ein anderes Rezeptorprofil auf, als Kardiomyozyten, in denen wir GPR22 als Vermittler der protektiven Effekte von 17,18-EEQ vermuten. Dies könnte die unterschiedliche Bindung der Stereoisomere erklären.

Während die spezifische Bindung beider Enantiomere durch 100 nM 17,18-EEQ in den Sf9-Kontrollzellen um ca. 30 % reduziert wurde, ließ sich die spezifische Bindung von  $[^3\text{H}]$ -14(S),15(R)-EET in GPR22 exprimierenden Zellen deutlich stärker durch 17,18-EEQ reduzieren als das R,S-Enantiomer (61 % vs. 13 %). Möglicherweise unterscheiden sich die beiden Enantiomere in der Affinität zu GPR22. Zur Aktivierung eines Rezeptors ist nicht immer eine besonders hohe Affinität des Liganden notwendig. Im Gegenteil, Antagonisten können den Rezeptor auch mit höherer Affinität als entsprechende Agonisten binden [156]. Aber auch die intrazelluläre Kopplung an G-Proteine vor oder nach Bindung des Liganden kann die Affinität des Liganden zum Rezeptor mit beeinflussen [250]. Möglicherweise spielt dies jedoch in Insektenzellen keine Rolle, denn in einer von Schneider et al. veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass G $\alpha$ i-ähnliche Proteine aus Insektenzellen nicht an Säuger-

GPCRs koppeln [251]. Demzufolge dürfte der heterolog exprimierte Rezeptor GPR22 in Insektenzellen ohne G-Protein Kopplung vorliegen.

In humanen Zellen, die GPR22 heterolog exprimierten, ist zu vermuten, dass die endogenen G $\alpha$ -Proteine der HEK293-Zellen nach Rezeptoraktivierung an den Rezeptor gebunden waren. Ähnlich wie bei den Insektenzellen wurde von den GPR22 exprimierenden HEK293-Zellen wesentlich mehr [ $^3$ H]-markierter Ligand gebunden als bei den entsprechenden Kontrollzellen, wobei hier keine stereospezifischen Unterschiede auftraten, Tabelle 15. Möglicherweise treten die Unterschiede nicht in der Bindungsstärke an den Rezeptor auf, sondern äußern sich erst in der Vermittlung intrazellulärer Signalkaskaden. Es ist von GPCRs bekannt, dass verschiedene Agonisten die Bindung spezifischer G-Proteine an den gleichen Rezeptor beeinflussen können [250]. Somit könnten die verschiedenen Stereoisomere vom [ $^3$ H]-14,15-EET zwar an GPR22 binden, aber diesen entweder inaktivieren oder durch bestimmte Konformationsänderungen nach Ligandenbindung bedingt eine Kopplung an andere G-Proteine als G $\alpha$ -Proteine, wie es nach Bindung mit 17,18-EEQ vermutet wird, auslösen.

In GPR22-exprimierenden Zellen wurde durch Zugabe von 100 nM 17,18-EEQ eine Reduktion der spezifischen Ligandenbindung zwischen 24 % und 38 % erreicht. Die Reduktion lag damit deutlich niedriger als in den Insektenzellen (Reduktion um 6 %). Möglicherweise ist die Affinität des Liganden aufgrund der Kopplung von GPR22 an endogene G $\alpha$ -Proteine in den HEK293-Zellen stärker als in den Insektenzellen, in denen eine Kopplung zu endogenen G $\alpha$ -ähnlichen Proteinen nur bedingt möglich ist. Daher ist zu vermuten, dass eine vergleichbare Reduktion der spezifischen Bindung in HEK293-Zellen nur mit höheren 17,18-EEQ-Konzentrationen erreichbar wäre.

Andere Arbeitsgruppen, die Ligandenbindungsstudien mit [ $^3$ H]-markiertem 14,15-EET in Membranen mononukleärer Zellen und U937-Zellmembranen durchgeführt haben, fanden eine hochaffine Bindungsstelle für 14,15-EET [68, 236], die stereospezifisch war. Die Bindung von 14(R),15(S)-EET an mononukleäre Zellen war 20-mal schwächer als an U937-Zellen, was darauf hindeutet, dass es sich in diesen Zellen möglicherweise um verschiedene Rezeptoren handelt [112]. Weiterführende Untersuchungen mit U937-Zellen führten zur Identifizierung eines 47 kDa großen Membranproteins, welches starke Affinität zu 11,12-EET und 14,15-EET aufwies [155]. Jüngste Bindungsstudien mit einem [ $^{125}$ I]-markierten 14,15-EET-Analog bestätigten diese Ergebnisse [156, 235]. Die molekulare Identität des 47 kDa großen Rezeptors konnte jedoch bislang nicht aufgeklärt werden. Auch Analysen mit einem 14,15-EET-Analog an HEK293-Zellmembranen von über 79 verschiedenen Klonen,

die jeweils verschiedene *orphan* GPCRs exprimierten, führten bis jetzt zu keinem Ergebnis [155]. Womöglich handelt es sich aber auch zwischen dem identifizierten 47 kDa großen Rezeptor und den hier vorgestellten möglichen Rezeptorkandidaten GPR22 um unterschiedliche Rezeptoren. Zumindest scheinen die beiden Rezeptoren an verschiedene G-Proteine gekoppelt zu sein. Während für den 47 kDa großen Rezeptor eine Kopplung an Gas-Proteine nachgewiesen wurde [235], war die Funktion von GPR22 von G $\alpha$ i-Proteinen abhängig [185]. Daher ist zu vermuten, dass die Suche nach Rezeptoren für CYP-Eicosanoide wohl eher eine Suche nach einer ganzen Klasse von Rezeptoren ist, als die Suche eines einzelnen Rezeptorkandidaten.

Können die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zu GPR22 in zukünftigen Versuchen zur Ligandenspezifität verifiziert werden, wäre GPR22 der erste identifizierte Rezeptor für CYP-Eicosanoide.



## 5 Limitationen und Ausblick

### 5.1.1 Ligandenbindungsstudien

[ $^3\text{H}$ ]-markiertes 14,15-EET wurde aus käuflicher, radioaktiv markierter AA synthetisiert. Die Synthese ist recht ineffizient und kostenintensiv. Die Ausbeute liegt unter 50 % da alle vier regioisomeren Epoxide in unterschiedlichen Mengen und zusätzlich Diepoxide entstehen [235]. Wir gehen aber davon aus, dass 17,18-EEQ der eigentliche endogene Ligand von GPR22 ist. [ $^3\text{H}$ ]-markierte EPA war für Bindungsversuche nicht kommerziell erhältlich. Alternativ wäre die Anwendung eines radioaktiv markierten Strukturanalogs möglich, welches eine höhere Stabilität des Metaboliten und zusätzlich eine höhere Sensitivität für weitere Ligandenbindungsstudien bieten würde. In Zusammenarbeit mit J.R. Falck (UT Southwestern, Dallas, Texas, USA) haben wir ein Struktur analog erhalten, dass durch Markierung mit [ $^{125}\text{I}$ ] in den Bindungstests eingesetzt werden könnte. Das kalte (nicht radioaktiv markierte) Struktur analog wurde bereits im Bioassay mit NRKMs getestet und zeigte einen negativ chronotropen Effekt ähnlich dem endogenen Liganden 17,18-EEQ. Unter Verwendung eines kompetitiven Assays, soll zukünftig die Bindungsaffinität verschiedener regio- und stereoisomeren Epoxide von AA, EPA und DHA verglichen werden. Dies soll helfen GPR22-spezifische Charakteristika gegenüber anderen möglichen EET-Rezeptoren, die eher vasodilatorische Funktionen vermitteln, herauszuarbeiten.

### 5.1.2 Rezeptorcharakterisierung

Neben der Bestätigung der Ligandenspezifität des Rezeptors sollen zukünftig Peptid-spezifische Antikörper in immunzytochemischen Analysen zur Anwendung kommen. Ziel ist es den Rezeptor genauer zu Charakterisieren. Bislang ist noch unbekannt, ob GPR22 nach Ligandenbindung z.B. internalisiert wird. Für GPCRs wurden verschiedene Mechanismen zur Rezeptorinternalisierung beschrieben. Sie beinhalten eine Internalisierung über *clathrin coated pits*, Caveolae und nicht ummantelte Vesikel [252].

Die Internalisierung von GPCRs stellt eine Form der Reduktion des GPCR-vermittelten Signals dar, aber auch andere Arten der Desensibilisierung sind bekannt. So können GPCRs über eine PKA- oder PKC-vermittelte Phosphorylierung, über den G-Protein-Kinase- $\beta$ -Arrestin-Signalweg, über einen Abbau in Lysosomen oder über sogenannte GTPase aktivierende Proteine, welche die GTP-Hydrolyse beschleunigen, inaktiviert werden [252-254]. Unter Anwendung entsprechender

Assays könnte man womöglich aufklären über welchen Weg GPR22 desensibilisiert wird und ob diese Desensibilisierung durch Zugabe von 17,18-EEQ bzw. dessen Strukturanaloga beeinflusst wird.

Über viele Jahre hinweg ging man davon aus, dass GPCRs als Monomere funktional sind. Jüngste Untersuchungen jedoch legen den Schluss nahe, dass GPCRs Dimere oder Oligomere höherer Ordnung bzw. Homodimere oder Heterodimere ausbilden können [255]. Eine Oligomerisierung von Rezeptoren kann die anschließenden Signalkaskaden auf verschiedene Arten beeinflussen: (i) Bindung verschiedener G $\alpha$ -Proteine, (ii) Agonist induzierte Oligomerisierung, (iii) Vermittlung der Stärke der Rezeptorphosphorylierung und (iv) asymmetrische Aktivierung von GPCRs im Oligomer. Die Rezeptordimerisierung von delta und kappa Opioidrezeptoren z.B. wirkte als Funktionsmodulator [256]. So war eine Agonist-induzierte Inhibition der Adenylatcyclase bei den Rezeptordimeren wesentlich stärker als bei den monomeren Rezeptoren. Zusätzlich veränderten sich auch die pharmakologischen Eigenschaften der Rezeptoren [252, 257]. Weitere Evidenz für die mögliche Dimerisierung von Lipidrezeptoren ist der Befund einer Homodimerisierung und Kopplung zu Gai-Proteinen vom LTB<sub>4</sub>-Rezeptor [258].

Sowohl die GPR22-heterolog exprimierenden Zellen als auch die endogen Rezeptor-exprimierenden NRKMs könnten zukünftig gut zur Untersuchung einer möglichen Rezeptordimerisierung verwendet werden. Dabei könnten Methoden wie die Ko-Immunopräzipitation, Crosslinking, Western blot Analysen zur Anwendung kommen. Unter Verwendung von Fusionsproteinen zwischen dem Rezeptor und biolumineszierenden oder fluoreszierenden Proteinen könnte mittels *bioluminescence resonance energy transfer* (BRET) oder *fluorecence resonance energy transfer* (FRET) Rezeptordimerisierung mikroskopisch nachgewiesen werden.

Der *orphan* GPCR GPR22 ließ sich phylogenetisch bislang nicht eindeutig zu einer Gruppe von Rezeptoren zuordnen. Seit den 1980'ern nutzt man Sequenzhomologien von Rezeptoren zur Klassifizierung der GPCRs. Unter diesen Rezeptoren befinden sich auch die *orphan* GPCRs. Da Rezeptoren mit ähnlicher Sequenz nicht zwangsläufig den gleichen Liganden binden oder gleiche Signaltransduktionsprozesse anstoßen, war dies z.T. nur bedingt hilfreich in der Identifizierung neuer Rezeptoren. In der sogenannten reversen Pharmakologie hingegen geht man umgekehrt vor: man nutzt einen *orphan* GPCRs zur Identifizierung eines möglichen Liganden [259]. Die meisten Liganden für Rezeptoren innerhalb der Rhodopsinfamilie binden in einer Vertiefung zwischen den TM-

Regionen [260]. Neuere Studien nutzten diese Informationen, um sogenannte chemogenomische Analysen durchzuführen, bei denen Rezeptoren hinsichtlich ihrer Bindungsdomänen verglichen werden [261]. Tatsächlich gelang damit eine Klassifizierung der GPCRs ähnlich den phylogenetischen Analysen mit der gesamten Sequenz. Mit Hilfe dieser Analysemethoden fand man heraus, dass sich GPR22 in eine Reihe von Melatoninrezeptoren gruppiert. Die Bedeutung dessen ist jedoch unklar.

### 5.1.3 Identifizierung verschiedener Signalkomponenten

Um die 17,18-EEQ Effekte besser zu verstehen sind weitere Experimente zur Identifizierung von Signalkomponenten, die an der Vermittlung des Effekts beteiligt sind, geplant. So sind z.B. *in vitro* Experimente geplant, die zeigen, ob 17,18-EEQ zu einer Reduktion des intrazellulären cAMP-Gehalts führt und ob sich dieser vermeintlich G $\alpha$ i-Protein vermittelte Effekt durch Zugabe von Pertussistoxin inhibieren lässt. Über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins werden durch 17,18-EEQ womöglich Signalkaskaden ausgelöst, die der ischämischen Vorkonditionierung ähneln, Abbildung 56. Ziel ist es einzelne Signalkomponenten aus dieser Kaskade auf den Einfluss von 17,18-EEQ oder Strukturanaloga hin zu überprüfen. Dazu sind u.a. Experimente geplant, die eine mögliche 17,18-EEQ vermittelte Erhöhung des intrazellulären NOs oder cGMP-Gehalts zeigen.

### 5.1.4 KO-Maus-Modell

Um die Bedeutung von GPR22 in der Vermittlung der kardioprotektiven Effekte von omega-3 PUFA *in vivo* genauer untersuchen zu können, ist die Entwicklung einer *knockout* (KO)-Maus geplant. Das KO-Modell liefert zunächst einen globalen KO von GPR22, der durch die Aktivität einer FLP-Rekombinase wieder in ein funktionelles Transkript umgewandelt werden kann. Letztlich besteht auch die Möglichkeit eines gewebespezifischen Ausschaltens des GPR22-Gens mittels Cre-Rekombinase. So kann das KO-Modell helfen die Auswirkung sowohl einer globalen als auch einer gewebespezifischen Reduktion der GPR22-Expression zu untersuchen. Dabei soll die Hypothese überprüft werden, ob GPR22 Vermittler kardioprotektiver und anti-arrhythmischer Effekte von n-3 PUFAs ist. Da GPR22 nachweislich auch in anderen Geweben als dem Herzen exprimiert wird, könnte die KO-Maus dazu verwendet werden, die *in vivo* Relevanz von GPR22 hinsichtlich weiterer schützender Effekte auf z.B. das Gehirn [183, 262-264] oder bei entzündlichen Erkrankungen wie Arthrose [265-267] zu untersuchen.

## Literaturverzeichnis

1. Arterburn, L.M., E.B. Hall, and H. Oken, *Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1467S-1476S.
2. Russo, G.L., *Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(6): p. 937-46.
3. Simopoulos, A.P., *Importance of the omega-6/omega-3 balance in health and disease: evolutionary aspects of diet*. World Rev Nutr Diet, 2011. **102**: p. 10-21.
4. Jump, D.B., *The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 8755-8.
5. Lands, W.E., *Dietary fat and health: the evidence and the politics of prevention: careful use of dietary fats can improve life and prevent disease*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1055**: p. 179-92.
6. Konkel, A. and W.H. Schunck, *Role of cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids*. Biochim Biophys Acta, 2011.
7. Kris-Etherton, P.M., W.S. Harris, and L.J. Appel, *Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease*. Circulation, 2002. **106**(21): p. 2747-57.
8. Mozaffarian, D. and J.H. Wu, *Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(20): p. 2047-67.
9. Sinclair, H.M., *Deficiency of essential fatty acids and atherosclerosis, etcetera*. Lancet, 1956. **270**(6919): p. 381-3.
10. Bang, H.O., J. Dyerberg, and N. Hjoorne, *The composition of food consumed by Greenland Eskimos*. Acta Med Scand, 1976. **200**(1-2): p. 69-73.
11. Dyerberg, J., *Coronary heart disease in Greenland Inuit: a paradox. Implications for western diet patterns*. Arctic Med Res, 1989. **48**(2): p. 47-54.
12. Bang, H.O., J. Dyerberg, and A.B. Nielsen, *Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos*. Lancet, 1971. **1**(7710): p. 1143-5.
13. Bang, H.O., J. Dyerberg, and H.M. Sinclair, *The composition of the Eskimo food in north western Greenland*. Am J Clin Nutr, 1980. **33**(12): p. 2657-61.
14. Wu, J.H., et al., *Association of plasma phospholipid long-chain omega-3 fatty acids with incident atrial fibrillation in older adults: the cardiovascular health study*. Circulation, 2012. **125**(9): p. 1084-93.
15. Simopoulos, A.P., *The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(6): p. 674-88.
16. Fischer, R., et al., *Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and direct renin inhibition improve electrical remodeling in a model of high human renin hypertension*. Hypertension, 2008. **51**(2): p. 540-6.
17. Gao, J.Y., et al., *Long-term treatment with eicosapentaenoic acid ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs in vivo. -Involvement of Rho-kinase pathway inhibition*. Circ J, 2011. **75**(8): p. 1843-51.

18. Matthan, N.R., et al., *A systematic review and meta-analysis of the impact of omega-3 fatty acids on selected arrhythmia outcomes in animal models*. Metabolism, 2005. **54**(12): p. 1557-65.
19. Kitamura, K., et al., *Eicosapentaenoic acid prevents atrial fibrillation associated with heart failure in a rabbit model*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(5): p. H1814-21.
20. Sarrazin, J.F., et al., *Reduced incidence of vagally induced atrial fibrillation and expression levels of connexins by n-3 polyunsaturated fatty acids in dogs*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(15): p. 1505-12.
21. Kang, J.X. and A. Leaf, *Effects of long-chain polyunsaturated fatty acids on the contraction of neonatal rat cardiac myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 9886-90.
22. Kang, J.X. and A. Leaf, *Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(1 Suppl): p. 202S-7S.
23. Kang, J.X. and A. Leaf, *Prevention and termination of beta-adrenergic agonist-induced arrhythmias by free polyunsaturated fatty acids in neonatal rat cardiac myocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **208**(2): p. 629-36.
24. Kang, J.X., Y.F. Xiao, and A. Leaf, *Free, long-chain, polyunsaturated fatty acids reduce membrane electrical excitability in neonatal rat cardiac myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3997-4001.
25. Wang, C., et al., *n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review*. Am J Clin Nutr, 2006. **84**(1): p. 5-17.
26. De Caterina, R., *n-3 fatty acids in cardiovascular disease*. N Engl J Med, 2011. **364**(25): p. 2439-50.
27. Lavie, C.J., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(7): p. 585-94.
28. Leaf, A., et al., *Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils*. Circulation, 2003. **107**(21): p. 2646-52.
29. Marchioli, R., et al., *Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione*. Circulation, 2002. **105**(16): p. 1897-903.
30. *Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico*. Lancet, 1999. **354**(9177): p. 447-55.
31. Benedetto, U., et al., *n-3 Polyunsaturated fatty acids for the prevention of postoperative atrial fibrillation: a meta-analysis of randomized controlled trials*. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2013. **14**(2): p. 104-9.
32. Calo, L., et al., *N-3 Fatty acids for the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery: a randomized, controlled trial*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(10): p. 1723-8.
33. Virtanen, J.K., et al., *Serum long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of hospital diagnosis of atrial fibrillation in men*. Circulation, 2009. **120**(23): p. 2315-21.

34. Nodari, S., et al., *n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of atrial fibrillation recurrences after electrical cardioversion: a prospective, randomized study*. Circulation, 2011. **124**(10): p. 1100-6.
35. Kwak, S.M., et al., *Efficacy of omega-3 fatty acid supplements (eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) in the secondary prevention of cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials*. Arch Intern Med, 2012. **172**(9): p. 686-94.
36. Rizos, E.C., et al., *Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis*. Jama, 2012. **308**(10): p. 1024-33.
37. de Lorgeril, M., et al., *Recent findings on the health effects of omega-3 fatty acids and statins, and their interactions: do statins inhibit omega-3?* BMC Med, 2013. **11**: p. 5.
38. Kromhout, D., et al., *Fish oil and omega-3 fatty acids in cardiovascular disease: do they really work?* Eur Heart J, 2012. **33**(4): p. 436-43.
39. Dyerberg, J. and H.O. Bang, *Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos*. Lancet, 1979. **2**(8140): p. 433-5.
40. Goodnight, S.H., Jr., W.S. Harris, and W.E. Connor, *The effects of dietary omega 3 fatty acids on platelet composition and function in man: a prospective, controlled study*. Blood, 1981. **58**(5): p. 880-5.
41. Harris, W.S., *The omega-3 index as a risk factor for coronary heart disease*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(6): p. 1997S-2002S.
42. von Schacky, C. and W.S. Harris, *Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(2): p. 310-5.
43. Harris, W.S., et al., *Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients: correlation with erythrocytes and response to supplementation*. Circulation, 2004. **110**(12): p. 1645-9.
44. von Schacky, C., *Use of red blood cell fatty-acid profiles as biomarkers in cardiac disease*. Biomark Med, 2009. **3**(1): p. 25-32.
45. Mozaffarian, D. and E.B. Rimm, *Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits*. Jama, 2006. **296**(15): p. 1885-99.
46. Calder, P.C., *n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1505S-1519S.
47. Chapkin, R.S., et al., *Bioactive dietary long-chain fatty acids: emerging mechanisms of action*. Br J Nutr, 2008. **100**(6): p. 1152-7.
48. Deckelbaum, R.J., T.S. Worgall, and T. Seo, *n-3 fatty acids and gene expression*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1520S-1525S.
49. Serhan, C.N., N. Chiang, and T.E. Van Dyke, *Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 349-61.
50. Xiao, Y.F., D.C. Sigg, and A. Leaf, *The antiarrhythmic effect of n-3 polyunsaturated fatty acids: modulation of cardiac ion channels as a potential mechanism*. J Membr Biol, 2005. **206**(2): p. 141-54.
51. Leifert, W.R., A. Jahangiri, and E.J. McMurchie, *Membrane fluidity changes are associated with the antiarrhythmic effects of docosahexaenoic acid in adult rat cardiomyocytes*. J Nutr Biochem, 2000. **11**(1): p. 38-44.

52. McLennan, P.L., *Myocardial membrane fatty acids and the antiarrhythmic actions of dietary fish oil in animal models*. *Lipids*, 2001. **36 Suppl**: p. S111-4.
53. Schmitz, G. and J. Ecker, *The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids*. *Prog Lipid Res*, 2008. **47**(2): p. 147-55.
54. Hirasawa, A., et al., *Free fatty acid receptors and drug discovery*. *Biol Pharm Bull*, 2008. **31**(10): p. 1847-51.
55. Oh, D.Y. and J.M. Olefsky, *Omega 3 fatty acids and GPR120*. *Cell Metab*, 2012. **15**(5): p. 564-5.
56. Westphal, C., A. Konkel, and W.H. Schunck, *CYP-eicosanoids--a new link between omega-3 fatty acids and cardiac disease?* *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2011. **96**(1-4): p. 99-108.
57. Mozaffarian, D., *Fish and n-3 fatty acids for the prevention of fatal coronary heart disease and sudden cardiac death*. *Am J Clin Nutr*, 2008. **87**(6): p. 1991S-6S.
58. Kang, J.X. and A. Leaf, *The cardiac antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acid*. *Lipids*, 1996. **31 Suppl**: p. S41-4.
59. Richardson, E.S., P.A. Iaizzo, and Y.F. Xiao, *Electrophysiological mechanisms of the anti-arrhythmic effects of omega-3 fatty acids*. *J Cardiovasc Transl Res*, 2011. **4**(1): p. 42-52.
60. Calder, P.C., *The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability*. *Mol Nutr Food Res*, 2012. **56**(7): p. 1073-80.
61. Harris, W.S., *Marine omega-3 Fatty acids and plaque stabilization*. *Curr Atheroscler Rep*, 2010. **12**(6): p. 357-8.
62. Connor, W.E., *Importance of n-3 fatty acids in health and disease*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**(1 Suppl): p. 171S-5S.
63. Harris, W.S., *n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies*. *Am J Clin Nutr*, 1997. **65**(5 Suppl): p. 1645S-1654S.
64. von Schacky, C., *A review of omega-3 ethyl esters for cardiovascular prevention and treatment of increased blood triglyceride levels*. *Vasc Health Risk Manag*, 2006. **2**(3): p. 251-62.
65. Davidson, M.H., *Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids*. *Am J Cardiol*, 2006. **98**(4A): p. 27i-33i.
66. Das, U.N., *Beneficial effect(s) of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: but, why and how?* *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2000. **63**(6): p. 351-62.
67. Oh, D.Y., et al., *GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects*. *Cell*, 2010. **142**(5): p. 687-98.
68. Wong, P.Y., et al., *14(R),15(S)-epoxyeicosatrienoic acid (14(R),15(S)-EET) receptor in guinea pig mononuclear cell membranes*. *J Lipid Mediat*, 1993. **6**(1-3): p. 199-208.
69. McLennan, P.L., et al., *Myocardial function, ischaemia and n-3 polyunsaturated fatty acids: a membrane basis*. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2007. **8 Suppl 1**: p. S15-8.
70. Wada, M., et al., *Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(31): p. 22254-66.

71. Shikano, M., et al., *Complete discrimination of docosahexaenoate from arachidonate by 85 kDa cytosolic phospholipase A2 during the hydrolysis of diacyl- and alkenylacylglycerophosphoethanolamine*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1212**(2): p. 211-6.
72. Jenkins, C.M., A. Cedars, and R.W. Gross, *Eicosanoid signalling pathways in the heart*. Cardiovasc Res, 2009. **82**(2): p. 240-9.
73. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
74. Terano, T., J.A. Salmon, and S. Moncada, *Biosynthesis and biological activity of leukotriene B5*. Prostaglandins, 1984. **27**(2): p. 217-32.
75. Serhan, C.N., et al., *Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions*. J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 15-23.
76. Li, Y., J.X. Kang, and A. Leaf, *Differential effects of various eicosanoids on the production or prevention of arrhythmias in cultured neonatal rat cardiac myocytes*. Prostaglandins, 1997. **54**(2): p. 511-30.
77. Billman, G.E., J.X. Kang, and A. Leaf, *Prevention of sudden cardiac death by dietary pure omega-3 polyunsaturated fatty acids in dogs*. Circulation, 1999. **99**(18): p. 2452-7.
78. Leaf, A., *The electrophysiologic basis for the antiarrhythmic and anticonvulsant effects of n-3 polyunsaturated fatty acids: heart and brain*. Lipids, 2001. **36 Suppl**: p. S107-10.
79. Xiao, Y.F., et al., *Suppression of voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 4182-7.
80. Xiao, Y.F., et al., *Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na<sup>+</sup> channels of neonatal rat ventricular myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(24): p. 11000-4.
81. Xiao, Y.F., et al., *Fatty acids suppress voltage-gated Na<sup>+</sup> currents in HEK293t cells transfected with the alpha-subunit of the human cardiac Na<sup>+</sup> channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2680-5.
82. Xiao, Y.F., et al., *Coexpression with beta(1)-subunit modifies the kinetics and fatty acid block of hH1(alpha) Na<sup>+</sup> channels*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(1): p. H35-46.
83. Xiao, Y.F., et al., *Inhibitory effect of n-3 fish oil fatty acids on cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange currents in HEK293t cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **321**(1): p. 116-23.
84. Tsuburaya, R., et al., *Eicosapentaenoic acid reduces ischemic ventricular fibrillation via altering monophasic action potential in pigs*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(3): p. 329-36.
85. Chaudhary, K.R., S.N. Batchu, and J.M. Seubert, *Cytochrome P450 enzymes and the heart*. IUBMB Life, 2009. **61**(10): p. 954-60.
86. Hasler, B., et al., *Human cytochromes P450*. Mol Aspects Med, 1999. **20**(1): p. 1-137.
87. Nelson, D.R., et al., *Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants*. Pharmacogenetics, 2004. **14**(1): p. 1-18.



88. Schunck, W.H. and C. Schmidt, *Cytochrome P450-Dependent Eicosanoids*, in *Cardiovascular Hormone Systems*, M. Bader, Editor. 2008, Wiley.
89. Nebert, D.W., et al., *The P450 gene superfamily: recommended nomenclature*. DNA, 1987. **6**(1): p. 1-11.
90. Fer, M., et al., *Metabolism of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by recombinant human cytochromes P450*. Arch Biochem Biophys, 2008. **471**(2): p. 116-25.
91. Lucas, D., et al., *Stereoselective epoxidation of the last double bond of polyunsaturated fatty acids by human cytochromes P450*. J Lipid Res, 2010. **51**(5): p. 1125-33.
92. Schwarz, D., et al., *Human CYP1A1 variants lead to differential eicosapentaenoic acid metabolite patterns*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **336**(3): p. 779-83.
93. Arnold, C., et al., *Arachidonic Acid-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes Are Targets of Omega-3 Fatty Acids*. J Biol Chem, 2010. **285**(43): p. 32720-31733.
94. Barbosa-Sicard, E., et al., *Eicosapentaenoic acid metabolism by cytochrome P450 enzymes of the CYP2C subfamily*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(4): p. 1275-81.
95. Lauterbach, B., et al., *Cytochrome P450-dependent eicosapentaenoic acid metabolites are novel BK channel activators*. Hypertension, 2002. **39**(2 Pt 2): p. 609-13.
96. Fer, M., et al., *Cytochromes P450 from family 4 are the main omega hydroxylating enzymes in humans: CYP4F3B is the prominent player in PUFA metabolism*. J Lipid Res, 2008. **49**(11): p. 2379-89.
97. Muller, D.N., et al., *Mouse Cyp4a isoforms: enzymatic properties, gender- and strain-specific expression, and role in renal 20-hydroxyeicosatetraenoic acid formation*. Biochem J, 2007. **403**(1): p. 109-18.
98. Harmon, S.D., et al., *Oxygenation of omega-3 fatty acids by human cytochrome P450 4F3B: effect on 20-hydroxyeicosatetraenoic acid production*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2006. **75**(3): p. 169-77.
99. Stark, K., et al., *Oxygenation of polyunsaturated long chain fatty acids by recombinant CYP4F8 and CYP4F12 and catalytic importance of Tyr-125 and Gly-328 of CYP4F8*. Arch Biochem Biophys, 2005. **441**(2): p. 174-81.
100. Capdevila, J.H. and J.R. Falck, *Biochemical and molecular properties of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **68-69**: p. 325-44.
101. Capdevila, J.H., J.R. Falck, and R.C. Harris, *Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase*. J Lipid Res, 2000. **41**(2): p. 163-81.
102. McGiff, J.C. and J. Quilley, *20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings*. Am J Physiol, 1999. **277**(3 Pt 2): p. R607-23.
103. Roman, R.J., *P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 131-85.
104. Zeldin, D.C., *Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36059-62.

105. Capdevila, J., et al., *Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(9): p. 5362-6.
106. Capdevila, J., et al., *The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P-450*. Biochem Biophys Res Commun, 1981. **101**(4): p. 1357-63.
107. Morrison, A.R. and N. Pascoe, *Metabolism of arachidonate through NADPH-dependent oxygenase of renal cortex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7375-8.
108. Oliw, E.H. and J.A. Oates, *Oxygenation of arachidonic acid by hepatic microsomes of the rabbit. Mechanism of biosynthesis of two vicinal dihydroxyecosatrienoic acids*. Biochim Biophys Acta, 1981. **666**(3): p. 327-40.
109. Arnold, C., et al., *Arachidonic Acid-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes Are Targets of Omega-3 Fatty Acids*. J Biol Chem, 2010.
110. Kroetz, D.L. and F. Xu, *Regulation and inhibition of arachidonic acid omega-hydroxylases and 20-HETE formation*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 413-38.
111. Wu, S., et al., *Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart*. J Biol Chem, 1996. **271**(7): p. 3460-8.
112. Spector, A.A., et al., *Epoxyecosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function*. Prog Lipid Res, 2004. **43**(1): p. 55-90.
113. Imig, J.D. and B.D. Hammock, *Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(10): p. 794-805.
114. Zeldin, D.C., et al., *Regio- and enantiofacial selectivity of epoxyecosatrienoic acid hydration by cytosolic epoxide hydrolase*. J Biol Chem, 1993. **268**(9): p. 6402-7.
115. Zeldin, D.C., et al., *Metabolism of epoxyecosatrienoic acids by cytosolic epoxide hydrolase: substrate structural determinants of asymmetric catalysis*. Arch Biochem Biophys, 1995. **316**(1): p. 443-51.
116. Kudo, I. and M. Murakami, *Phospholipase A2 enzymes*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **68-69**: p. 3-58.
117. Perez-Chacon, G., et al., *Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A2 and lysophospholipid acyltransferases*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(12): p. 1103-13.
118. Carroll, M.A., et al., *Cytochrome P450-derived renal HETEs: storage and release*. Kidney Int, 1997. **51**(6): p. 1696-702.
119. Karara, A., et al., *Endogenous epoxyecosatrienoyl-phospholipids. A novel class of cellular glycerolipids containing epoxidized arachidonate moieties*. J Biol Chem, 1991. **266**(12): p. 7561-9.
120. Nakamura, H., et al., *Subcellular characteristics of phospholipase A2 activity in the rat kidney. Enhanced cytosolic, mitochondrial, and microsomal phospholipase A2 enzymatic activity after renal ischemia and reperfusion*. J Clin Invest, 1991. **87**(5): p. 1810-8.
121. Phillis, J.W. and M.H. O'Regan, *A potentially critical role of phospholipases in central nervous system ischemic, traumatic, and neurodegenerative disorders*. Brain Res Brain Res Rev, 2004. **44**(1): p. 13-47.

122. Seubert, J., et al., *Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and p42/p44 MAPK pathway*. *Circ Res*, 2004. **95**(5): p. 506-14.
123. Monti, J., et al., *Soluble epoxide hydrolase is a susceptibility factor for heart failure in a rat model of human disease*. *Nat Genet*, 2008. **40**(5): p. 529-37.
124. Nithipatikom, K., et al., *Inhibition of cytochrome P450 omega-hydroxylase: a novel endogenous cardioprotective pathway*. *Circ Res*, 2004. **95**(8): p. e65-71.
125. Wu, S., et al., *Molecular cloning, expression, and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(19): p. 12551-9.
126. Batchu, S.N., et al., *Epoxyeicosatrienoic acid prevents postischemic electrocardiogram abnormalities in an isolated heart model*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **46**(1): p. 67-74.
127. Gross, G.J., et al., *Effects of the selective EET antagonist, 14,15-EEZE, on cardioprotection produced by exogenous or endogenous EETs in the canine heart*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **294**(6): p. H2838-44.
128. Gross, G.J., et al., *Mechanisms by which epoxyeicosatrienoic acids (EETs) elicit cardioprotection in rat hearts*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **42**(3): p. 687-91.
129. Seubert, J.M., et al., *Role of epoxyeicosatrienoic acids in protecting the myocardium following ischemia/reperfusion injury*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2007. **82**(1-4): p. 50-9.
130. Yu, G.G., et al., *Cytochrome P450 2J3/epoxyeicosatrienoic acids mediate the cardioprotection induced by ischaemic post-conditioning, but not preconditioning, in the rat*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2011. **38**(1): p. 63-70.
131. Zhang, Y., et al., *Overexpression of CYP2J2 provides protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **297**(1): p. H37-46.
132. Westphal, C., et al., *CYP2J2 Overexpression Protects against Arrhythmia Susceptibility in Cardiac Hypertrophy*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e73490.
133. Xu, D., et al., *Prevention and reversal of cardiac hypertrophy by soluble epoxide hydrolase inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(49): p. 18733-8.
134. Ai, D., et al., *Soluble epoxide hydrolase plays an essential role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(2): p. 564-9.
135. Seubert, J.M., et al., *Role of soluble epoxide hydrolase in postischemic recovery of heart contractile function*. *Circ Res*, 2006. **99**(4): p. 442-50.
136. Nithipatikom, K., et al., *Effects of selective inhibition of cytochrome P-450 omega-hydroxylases and ischemic preconditioning in myocardial protection*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(2): p. H500-5.
137. Miyata, N., et al., *Beneficial effects of a new 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis inhibitor, TS-011 [N-(3-chloro-4-morpholin-4-yl) phenyl-N'-hydroxyimido formamide], on hemorrhagic and ischemic stroke*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **314**(1): p. 77-85.
138. Nithipatikom, K., et al., *Determination of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in coronary venous plasma during ischemia and reperfusion in dogs*. *Anal Biochem*, 2001. **292**(1): p. 115-24.

139. Node, K., et al., *Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids*. Science, 1999. **285**(5431): p. 1276-9.
140. Rompe, F., et al., *Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB*. Hypertension, 2010. **55**(4): p. 924-31.
141. Bodiga, S., et al., *Protective actions of epoxyeicosatrienoic acid: dual targeting of cardiovascular PI3K and KATP channels*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 978-88.
142. Katragadda, D., et al., *Epoxyeicosatrienoic acids limit damage to mitochondrial function following stress in cardiac cells*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 867-75.
143. Lee, H.C., et al., *Effects of epoxyeicosatrienoic acids on the cardiac sodium channels in isolated rat ventricular myocytes*. J Physiol, 1999. **519 Pt 1**: p. 153-68.
144. Lu, T., et al., *Activation of ATP-sensitive K(+) channels by epoxyeicosatrienoic acids in rat cardiac ventricular myocytes*. J Physiol, 2001. **537**(Pt 3): p. 811-27.
145. Xiao, Y.F., *Cyclic AMP-dependent modulation of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> and transient outward K<sup>+</sup> channel activities by epoxyeicosatrienoic acids*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2007. **82**(1-4): p. 11-8.
146. Xiao, Y.F., L. Huang, and J.P. Morgan, *Cytochrome P450: a novel system modulating Ca<sup>2+</sup> channels and contraction in mammalian heart cells*. J Physiol, 1998. **508 ( Pt 3)**: p. 777-92.
147. Miura, T., T. Miki, and T. Yano, *Role of the gap junction in ischemic preconditioning in the heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(4): p. H1115-25.
148. Lu, T., M. VanRollins, and H.C. Lee, *Stereospecific activation of cardiac ATP-sensitive K(+) channels by epoxyeicosatrienoic acids: a structural determinant study*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(5): p. 1076-83.
149. Hercule, H.C., et al., *The vasodilator 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid targets the pore-forming BK alpha channel subunit in rodents*. Exp Physiol, 2007. **92**(6): p. 1067-76.
150. Ye, D., et al., *Cytochrome p-450 epoxygenase metabolites of docosahexaenoate potently dilate coronary arterioles by activating large-conductance calcium-activated potassium channels*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(2): p. 768-76.
151. Zhang, Y., et al., *EET homologs potently dilate coronary microvessels and activate BK(Ca) channels*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(6): p. H2430-40.
152. Morin, C., et al., *17,18-EpETE Targets PPAR{gamma} and p38MAPK to Mediate its Anti-Inflammatory Effect in Lung: Role of sEH*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009.
153. Morin, C., et al., *Relaxing effects of 17(18)-EpETE on arterial and airway smooth muscles in human lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **296**(1): p. L130-9.
154. Spector, A.A., *Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S52-6.

155. Chen, Y., et al., *20-Iodo-14,15-epoxyeicosa-8(Z)-enoyl-3-azidophenylsulfonamide: photoaffinity labeling of a 14,15-epoxyeicosatrienoic acid receptor*. Biochemistry, 2011. **50**(18): p. 3840-8.
156. Chen, Y., et al., *20-125Iodo-14,15-epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid: a high-affinity radioligand used to characterize the epoxyeicosatrienoic acid antagonist binding site*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **331**(3): p. 1137-45.
157. Li, P.L., et al., *11,12-Epoxyeicosatrienoic acid stimulates endogenous mono-ADP-ribosylation in bovine coronary arterial smooth muscle*. Circ Res, 1999. **85**(4): p. 349-56.
158. Downey, J.M., T. Krieg, and M.V. Cohen, *Mapping preconditioning's signaling pathways: an engineering approach*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1123**: p. 187-96.
159. Gross, E.R., A.K. Hsu, and G.J. Gross, *Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts*. Circ Res, 2004. **94**(7): p. 960-6.
160. Bjarnadottir, T.K., et al., *Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse*. Genomics, 2006. **88**(3): p. 263-73.
161. Hirasawa, A., et al., *Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120*. Nat Med, 2005. **11**(1): p. 90-4.
162. Im, D.S., *Omega-3 fatty acids in anti-inflammation (pro-resolution) and GPCRs*. Prog Lipid Res, 2012. **51**(3): p. 232-7.
163. Krishnamoorthy, S., et al., *Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1660-5.
164. Singh, R.K., et al., *Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics*. Pharmacology, 2010. **85**(6): p. 336-49.
165. Toda, A., T. Yokomizo, and T. Shimizu, *Leukotriene B4 receptors*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **68-69**: p. 575-85.
166. Narumiya, S., Y. Sugimoto, and F. Ushikubi, *Prostanoid receptors: structures, properties, and functions*. Physiol Rev, 1999. **79**(4): p. 1193-226.
167. Sugimoto, Y. and S. Narumiya, *Prostaglandin E receptors*. J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 11613-7.
168. Smyth, E.M. and G.A. FitzGerald, *Human prostacyclin receptor*. Vitam Horm, 2002. **65**: p. 149-65.
169. Huang, J.S., et al., *Cell signalling through thromboxane A2 receptors*. Cell Signal, 2004. **16**(5): p. 521-33.
170. Chiang, N., et al., *The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(3): p. 463-87.
171. Grant, G.E., J. Rokach, and W.S. Powell, *5-Oxo-ETE and the OXE receptor*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2009. **89**(3-4): p. 98-104.
172. Hosoi, T., et al., *Identification of a novel human eicosanoid receptor coupled to G(i/o)*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 31459-65.
173. Guo, Y., et al., *Identification of the orphan G protein-coupled receptor GPR31 as a receptor for 12-(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid*. J Biol Chem, 2011. **286**(39): p. 33832-40.

174. Brown, A.J., et al., *The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids*. J Biol Chem, 2003. **278**(13): p. 11312-9.
175. Wang, J., et al., *Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84*. J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34457-64.
176. Harris, W.S. and C. Von Schacky, *The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease?* Prev Med, 2004. **39**(1): p. 212-20.
177. Lander, R.J., et al., *Fractional precipitation of plasmid DNA from lysate by CTAB*. Biotechnol Bioeng, 2002. **79**(7): p. 776-84.
178. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
179. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
180. Falck, J.R., et al., *17(R),18(S)-Epoxyeicosatetraenoic acid, a potent anti-arrhythmic EPA metabolite: SAR and stable analogs*. J. Med. Chem., 2011.
181. West, R.E., Jr., et al., *Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site*. J Biol Chem, 1985. **260**(27): p. 14428-30.
182. Gloriam, D.E., R. Fredriksson, and H.B. Schioth, *The G protein-coupled receptor subset of the rat genome*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 338.
183. O'Dowd, B.F., et al., *Cloning and chromosomal mapping of four putative novel human G-protein-coupled receptor genes*. Gene, 1997. **187**(1): p. 75-81.
184. Lee, J., et al., *Effects of RNA degradation on gene expression analysis of human postmortem tissues*. Faseb J, 2005. **19**(10): p. 1356-8.
185. Adams, J.W., et al., *Myocardial expression, signaling, and function of GPR22: a protective role for an orphan G protein-coupled receptor*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(2): p. H509-21.
186. Andersson, A., et al., *Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary fat composition in humans*. Am J Clin Nutr, 2002. **76**(6): p. 1222-9.
187. Marangoni, F., et al., *Changes of n-3 and n-6 fatty acids in plasma and circulating cells of normal subjects, after prolonged administration of 20:5 (EPA) and 22:6 (DHA) ethyl esters and prolonged washout*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1210**(1): p. 55-62.
188. Harris, W.S., *Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a case for omega-3 index as a new risk factor*. Pharmacol Res, 2007. **55**(3): p. 217-23.
189. Keenan, A.H., et al., *Basal omega-3 fatty acid status affects fatty acid and oxylipin responses to high-dose n3-HUFA in healthy volunteers*. J Lipid Res, 2012. **53**(8): p. 1662-9.
190. Den Ruijter, H.M., A.O. Verkerk, and R. Coronel, *Incorporated fish oil fatty acids prevent action potential shortening induced by circulating fish oil fatty acids*. Front Physiol, 2010. **1**: p. 149.
191. von Schacky, C., *The Omega-3 Index as a risk factor for cardiovascular diseases*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2011. **96**(1-4): p. 94-8.
192. Bakewell, L., G.C. Burdge, and P.C. Calder, *Polyunsaturated fatty acid concentrations in young men and women consuming their habitual diets*. Br J Nutr, 2006. **96**(1): p. 93-9.

193. Childs, C.E., et al., *Gender differences in the n-3 fatty acid content of tissues*. Proc Nutr Soc, 2008. **67**(1): p. 19-27.
194. Jump, D.B., C.M. Depner, and S. Tripathy, *Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease*. J Lipid Res, 2012. **53**(12): p. 2525-45.
195. Metcalf, R.G., et al., *Effects of fish-oil supplementation on myocardial fatty acids in humans*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(5): p. 1222-8.
196. Cao, J., et al., *Incorporation and clearance of omega-3 fatty acids in erythrocyte membranes and plasma phospholipids*. Clin Chem, 2006. **52**(12): p. 2265-72.
197. Mozaffarian, D. and J.H. Wu, *(n-3) fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary?* J Nutr, 2012. **142**(3): p. 614S-625S.
198. Gao, F., et al., *Whole-body synthesis secretion of docosahexaenoic acid from circulating eicosapentaenoic acid in unanesthetized rats*. J Lipid Res, 2009. **50**(12): p. 2463-70.
199. Tu, W.C., et al., *Correlations between blood and tissue omega-3 LCPUFA status following dietary ALA intervention in rats*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013. **88**(1): p. 53-60.
200. Sun, Q., et al., *Blood concentrations of individual long-chain n-3 fatty acids and risk of nonfatal myocardial infarction*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(1): p. 216-23.
201. Mozaffarian, D., et al., *Circulating long-chain omega-3 fatty acids and incidence of congestive heart failure in older adults: the cardiovascular health study: a cohort study*. Ann Intern Med, 2011. **155**(3): p. 160-70.
202. Dalli, J., R.A. Colas, and C.N. Serhan, *Novel n-3 immunoresolvents: structures and actions*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 1940.
203. Knapp, H.R., A.J. Miller, and J.A. Lawson, *Urinary excretion of diols derived from eicosapentaenoic acid during n-3 fatty acid ingestion by man*. Prostaglandins, 1991. **42**(1): p. 47-54.
204. Shearer, G.C., et al., *Detection of omega-3 oxylipins in human plasma and response to treatment with omega-3 acid ethyl esters*. J Lipid Res, 2010. **51**(8): p. 2074-81.
205. Quehenberger, O., et al., *Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma*. J Lipid Res, 2010. **51**(11): p. 3299-305.
206. Strassburg, K., et al., *Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis: application in cardiac surgery*. Anal Bioanal Chem, 2012. **404**(5): p. 1413-26.
207. Schuchardt, J.P., et al., *Comparison of free serum oxylipin concentrations in hyper- vs. normolipidemic men*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013.
208. Askari, A., et al., *Roles of the epoxygenase CYP2J2 in the endothelium*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2013.
209. Delozier, T.C., et al., *Detection of human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in cardiovascular tissues*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(4): p. 682-8.
210. Fleming, I., et al., *Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries*. Circ Res, 2001. **88**(1): p. 44-51.

211. Karara, A., et al., *Arachidonic acid epoxygenase: structural characterization and quantification of epoxyeicosatrienoates in plasma*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **182**(3): p. 1320-5.
212. Schwarz, D., et al., *Arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism by human CYP1A1: highly stereoselective formation of 17(R),18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid*. Biochem Pharmacol, 2004. **67**(8): p. 1445-57.
213. Kaduce, T.L., et al., *20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) metabolism in coronary endothelial cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(4): p. 2648-56.
214. Yang, W., et al., *Stable 5,6-epoxyeicosatrienoic acid analog relaxes coronary arteries through potassium channel activation*. Hypertension, 2005. **45**(4): p. 681-6.
215. Fulton, D., et al., *A method for the determination of 5,6-EET using the lactone as an intermediate in the formation of the diol*. J Lipid Res, 1998. **39**(8): p. 1713-21.
216. Spector, A.A. and A.W. Norris, *Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(3): p. C996-1012.
217. Schmidt, C., *Identifizierung, molekulare Eigenschaften und Regulation einer renalen 20-Hydroxyeicosatetraensäure-Synthese*. 2009, Humboldt Universität zu Berlin: Humboldt Universität zu Berlin.
218. Morisseau, C., et al., *Naturally occurring monoepoxides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are bioactive antihyperalgesic lipids*. J Lipid Res, 2010. **51**(12): p. 3481-90.
219. Morisseau, C., *Role of epoxide hydrolases in lipid metabolism*. Biochimie, 2013. **95**(1): p. 91-5.
220. Morisseau, C. and B.D. Hammock, *Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2013. **53**: p. 37-58.
221. Dyerberg, J., et al., *Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?* Lancet, 1978. **2**(8081): p. 117-9.
222. Howe, P.R., *Dietary fats and hypertension. Focus on fish oil*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **827**: p. 339-52.
223. Mozaffarian, D., *Fish, n-3 fatty acids, and cardiovascular haemodynamics*. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2007. **8 Suppl 1**: p. S23-6.
224. Wachter, S.B. and E.M. Gilbert, *Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application*. Cardiology, 2012. **122**(2): p. 104-12.
225. Liu, Y., et al., *Mitochondrial ATP-dependent potassium channels. Viable candidate effectors of ischemic preconditioning*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **874**: p. 27-37.
226. O'Rourke, B., *Evidence for mitochondrial K<sup>+</sup> channels and their role in cardioprotection*. Circ Res, 2004. **94**(4): p. 420-32.
227. Kim, M.Y., et al., *Diazoxide acts more as a PKC-epsilon activator, and indirectly activates the mitochondrial K(ATP) channel conferring cardioprotection against hypoxic injury*. Br J Pharmacol, 2006. **149**(8): p. 1059-70.
228. Oliw, E.H., *17R(18S)epoxyeicosatetraenoic acid, a cytochrome P-450 metabolite of 20:5n-3 in monkey seminal vesicles, is metabolized to novel prostaglandins*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **178**(3): p. 1444-50.



229. Cowart, L.A., et al., *The CYP4A isoforms hydroxylate epoxyeicosatrienoic acids to form high affinity peroxisome proliferator-activated receptor ligands*. J Biol Chem, 2002. **277**(38): p. 35105-12.
230. Sudhahar, V., S. Shaw, and J.D. Imig, *Epoxyeicosatrienoic acid analogs and vascular function*. Curr Med Chem, 2010. **17**(12): p. 1181-90.
231. Falck, J.R., et al., *Comparison of vasodilatory properties of 14,15-EET analogs: structural requirements for dilation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(1): p. H337-49.
232. Gauthier, K.M., et al., *14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid: a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries*. Circ Res, 2002. **90**(9): p. 1028-36.
233. Falck, J.R., et al., *14,15-Epoxyeicosa-5,8,11-trienoic acid (14,15-EET) surrogates containing epoxide bioisosteres: influence upon vascular relaxation and soluble epoxide hydrolase inhibition*. J Med Chem, 2009. **52**(16): p. 5069-75.
234. Ng, V.Y., et al., *Cytochrome P450 eicosanoids are activators of peroxisome proliferator-activated receptor alpha*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(7): p. 1126-34.
235. Yang, W., et al., *Characterization of epoxyeicosatrienoic acid binding site in U937 membranes using a novel radiolabeled agonist, 20-125i-14,15-epoxyeicosa-8(Z)-enoic acid*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **324**(3): p. 1019-27.
236. Wong, P.Y., et al., *Post-receptor signal transduction and regulation of 14(R),15(S)-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) binding in U-937 cells*. J Lipid Mediat Cell Signal, 1997. **16**(3): p. 155-69.
237. Wong, P.Y., P.S. Lai, and J.R. Falck, *Mechanism and signal transduction of 14 (R), 15 (S)-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) binding in guinea pig monocytes*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2000. **62**(4): p. 321-33.
238. Node, K., et al., *Activation of Galpha s mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 15983-9.
239. Li, P.L. and W.B. Campbell, *Epoxyeicosatrienoic acids activate K<sup>+</sup> channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein*. Circ Res, 1997. **80**(6): p. 877-84.
240. Rask-Andersen, M., M.S. Almen, and H.B. Schioth, *Trends in the exploitation of novel drug targets*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(8): p. 579-90.
241. Jansen, J.A., et al., *Cardiac connexins and impulse propagation*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(1): p. 76-82.
242. Radosinska, J., et al., *Dietary omega-3 fatty acids attenuate myocardial arrhythmogenic factors and propensity of the heart to lethal arrhythmias in a rodent model of human essential hypertension*. J Hypertens, 2013.
243. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 240-53.
244. Costa, A.D. and K.D. Garlid, *Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(2): p. H874-82.

245. Gross, G.J., et al., *Roles of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and mitochondrial permeability transition pore (MPTP) in epoxyeicosatrienoic acid (EET)-induced cardioprotection against infarction in intact rat hearts*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **59**: p. 20-9.
246. Garlid, K.D., et al., *Cardioprotective signaling to mitochondria*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 858-66.
247. Schulein, R., et al., *Functional significance of cleavable signal peptides of G protein-coupled receptors*. Eur J Cell Biol, 2012. **91**(4): p. 294-9.
248. Kochl, R., et al., *The signal peptide of the G protein-coupled human endothelin B receptor is necessary for translocation of the N-terminal tail across the endoplasmic reticulum membrane*. J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 16131-8.
249. Grunewald, S., et al., *Glycosylation, palmitoylation, and localization of the human D2S receptor in baculovirus-infected insect cells*. Biochemistry, 1996. **35**(48): p. 15149-61.
250. Oldham, W.M. and H.E. Hamm, *Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 60-71.
251. Schneider, E.H. and R. Seifert, *Sf9 cells: a versatile model system to investigate the pharmacological properties of G protein-coupled receptors*. Pharmacol Ther, 2010. **128**(3): p. 387-418.
252. Pierce, K.L., R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz, *Seven-transmembrane receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 639-50.
253. Lawler, O.A., S.M. Miggin, and B.T. Kinsella, *Protein kinase A-mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to G(s)-, to G(i)-, and to G(q)-coupled effector signaling*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33596-607.
254. Sato, M., *Roles of accessory proteins for heterotrimeric g-protein in the development of cardiovascular diseases*. Circ J, 2013. **77**(10): p. 2455-61.
255. Moreira, I.S., *Structural features of the G-protein/GPCR interactions*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1840**(1): p. 16-33.
256. Jordan, B.A. and L.A. Devi, *G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function*. Nature, 1999. **399**(6737): p. 697-700.
257. Bouvier, M., *Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(4): p. 274-86.
258. Baneres, J.L. and J. Parello, *Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein*. J Mol Biol, 2003. **329**(4): p. 815-29.
259. Civelli, O., et al., *Orphan GPCRs and their ligands*. Pharmacol Ther, 2006. **110**(3): p. 525-32.
260. Baldwin, J.M., *Structure and function of receptors coupled to G proteins*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(2): p. 180-90.
261. Surgand, J.S., et al., *A chemogenomic analysis of the transmembrane binding cavity of human G-protein-coupled receptors*. Proteins, 2006. **62**(2): p. 509-38.
262. Bazan, N.G., J.M. Calandria, and W.C. Gordon, *Docosahexaenoic Acid and Its Derivative Neuroprotectin D1 Display Neuroprotective Properties in the Retina, Brain and Central Nervous System*. Nestle Nutr Inst Workshop Ser, 2013. **77**: p. 121-131.

- 263. Grossfield, A., S.E. Feller, and M.C. Pitman, *A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by omega-3 polyunsaturated lipids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 4888-93.
- 264. Carlson, S.J., et al., *The role of the omega-3 fatty acid DHA in the human life cycle*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2013. **37**(1): p. 15-22.
- 265. Kerkhof, H.J., et al., *A genome-wide association study identifies an osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 7q22*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(2): p. 499-510.
- 266. Cleland, L.G. and M.J. James, *Rheumatoid arthritis and the balance of dietary N-6 and N-3 essential fatty acids*. Br J Rheumatol, 1997. **36**(5): p. 513-4.
- 267. James, M.J. and L.G. Cleland, *Dietary n-3 fatty acids and therapy for rheumatoid arthritis*. Semin Arthritis Rheum, 1997. **27**(2): p. 85-97.

## Appendix

1	M_C_F_S_P_I_L_E_I_N_M_Q_S_E_S_N_I_T_V_R	Protein
1	ATGTGTTTTCTCCCATCTCTGGAAATCAACATGCAGTCTGAATCTAACATTACAGTGCGA	GPR22
1	ATGTGCTTCAGCCCCATCCTGGAAATCAACATGCAGAGCGAGAGCAACATCACCGTGCGG	GPRopt
21	D_D_I_D_D_I_N_T_N_M_Y_Q_P_L_S_Y_P_L_S_F	Protein
61	GATGACATTGATGACATCAACACCAATATGTACCAACCACTATCATATCCGTTAAGCTTT	GPR22
61	GACGACATCGACGATATCAACACCAACATGTACCAGCCCCTGAGCTACCACTGAGCTTC	GPRopt
41	Q_V_S_L_T_G_F_L_M_L_E_I_V_L_G_L_G_S_N_L	Protein
121	CAAGTGCTCTCACCGGATTTCTTATGTTAGAAATTGTGTTGGGACTTGGCAGCAACCTC	GPR22
121	CAGGTGTCCCTGACCGGCTTCCTGATGCTGGAAATCGTGCTGGGCCTGGGCAGCAACCTG	GPRopt
61	T_V_L_V_L_Y_C_M_K_S_N_L_I_N_S_V_S_N_I_I	Protein
181	ACTGTATTGGTACTTTACTGCATGAAATCCAACCTTAATCAACTCTGTGAGTAACATTATT	GPR22
181	ACCGTGCTGGTGCTGTACTGCATGAAGTCCAACCTGATCAACAGCGTGTCCAACATCATC	GPRopt
81	T_M_N_L_H_V_L_D_V_I_I_C_V_G_C_I_P_L_T_I	Protein
241	ACAATGAATCTTCATGTACTTGATGTAATAATTTGTGTGGGATGTATTCTCTAACTATA	GPR22
241	ACCATGAACCTGCACGTGCTGGACGTGATCATCTGCGTGGGCTGCATCCCCCTGACCATC	GPRopt
101	V_I_L_L_L_S_L_E_S_N_T_A_L_I_C_C_F_H_E_A	Protein
301	GTTATCCTTCTGCTTTCACTGGAGAGTAACACTGCTCTCATTTGCTGTTTCCATGAGGCT	GPR22
301	GTGATCCTGCTGCTGAGCCTGGAAAGCAACACCGCCCTGATCTGCTGCTTCCACGAGGCC	GPRopt
121	C_V_S_F_A_S_V_S_T_A_I_N_V_F_A_I_T_L_D_R	Protein
361	TGTGTATCTTTTGCAAGTGTCTCAACAGCAATCAACGTTTTTGCTATCACTTTGGACAGA	GPR22
361	TGCGTGTCTTTCGCCTCCGTGTCCACCGCCATCAACGTGTTGCCATCACCTGGACAGA	GPRopt
141	Y_D_I_S_V_K_P_A_N_R_I_L_T_M_G_R_A_V_M_L	Protein
421	TATGACATCTCTGTAAACCTGCAAACCGAATTCTGACAATGGGCAGAGCTGTAATGTTA	GPR22
421	TACGACATCAGCGTGAAGCCCGCCAACAGAATCTGACCATGGGCAGAGCCGTGATGCTG	GPRopt
161	M_I_S_I_W_I_F_S_F_F_S_F_L_I_P_F_I_E_V_N	Protein
481	ATGATATCCATTTGGATTTTTCTTTTTCTTTCTCTTCTGATTCCTTTTATTGAGGTAAAT	GPR22
481	ATGATCTCTATCTGGATCTTCAGCTTCTTCAGTTTCCTGATCCCCTTCATCGAAGTGAAT	GPRopt
181	F_F_S_L_Q_S_G_N_T_W_E_N_K_T_L_L_C_V_S_T	Protein
541	TTTTTCAGTCTTCAAAGTGGAAATACCTGGGAAAACAAGACACTTTTATGTGTCAGTACA	GPR22
541	TTCTTCAGCCTGCAGTCCGGCAACACCTGGGAGAACAAGACCCTGCTGTGCGTGTCCACC	GPRopt

201	N__E__Y__Y__T__E__L__G__M__Y__Y__H__L__L__V__Q__I__P__I__F__	Protein
601	AATGAATACTACACTGAACTGGGAATGTATTATCACCTGTTAGTACAGATCCCAATATTC	GPR22
601	AACGAGTACTACACCGAGCTGGGCATGTACTACCATCTGCTGGTGCAGATCCCTATCTTC	GPRopt
221	F__F__T__V__V__V__M__L__I__T__Y__T__K__I__L__Q__A__L__N__I__	Protein
661	TTTTTCACTGTTGTAGTAATGTTAATCACATACACAAAATACTTCAGGCTCTTAATATT	GPR22
661	TTCTTCACCGTGGTGGTGTGCTGATCACCTACACCAAGATCCTGCAGGCCCTGAACATC	GPRopt
241	R__I__G__T__R__F__S__T__G__Q__K__K__K__A__R__K__K__K__T__I__	Protein
721	CGAATAGGCACAAGATTTTCAACAGGGCAGAAGAAGAAAGCAAGAAAGAAAAAGACAATT	GPR22
721	CGGATCGGCACCCGGTTCAGCACCGGCCAGAAGAAGAAGGCCCGGAAGAAGAAAACCATC	GPRopt
261	S__L__T__T__Q__H__E__A__T__D__M__S__Q__S__S__G__G__R__N__V__	Protein
781	TCTCTAACCACACAACATGAGGCTACAGACATGTCACAAAGCAGTGGTGGGAGAAATGTA	GPR22
781	AGCCTGACCACCCAGCAGCAGGCCACCGACATGAGCCAGAGCAGCGGCGGCAGAAACGTG	GPRopt
281	V__F__G__V__R__T__S__V__S__V__I__I__A__L__R__R__A__V__K__R__	Protein
841	GTCTTTGGTGTAAAGAACTTCAGTTTCTGTAATAATTGCCCTCCGGCGAGCTGTGAAACGA	GPR22
841	GTGTTCCGGCTGCGGACCAGCGTGTCCGTGATCATTGCCCTGCGGAGAGCCGTGAAGCGG	GPRopt
301	H__R__E__R__R__E__R__Q__K__R__V__F__R__M__S__L__L__I__I__S__	Protein
901	CACCGTGAACGACGAGAAAGACAAAAGAGAGTCTTCAGGATGTCTTTATTGATTATTTCT	GPR22
901	CACAGAGAGCGGCGCGAGAGACAGAAAAGGGTGTTCCGGATGAGCCTGCTGATCATCAGC	GPRopt
321	T__F__L__L__C__W__T__P__I__S__V__L__N__T__T__I__L__C__L__G__	Protein
961	ACATTTCTTCTCTGCTGGACCAATTTCTGTTTTAAATACCACCATTTTATGTTTAGGC	GPR22
961	ACCTTTCTGCTGTGCTGGACCCCATCAGCGTGTGTAACACCACCATCCTGTGCCTGGGC	GPRopt
341	P__S__D__L__L__V__K__L__R__L__C__F__L__V__M__A__Y__G__T__T__	Protein
1021	CCAAGTGACCTTTTAGTAAAATTAAGATTGTGTTTTTTAGTCATGGCTTATGGAACAACT	GPR22
1021	CCCAGCGACCTGCTGGTGAAACTGCGGCTGTGCTTCCTGGTGATGGCCTACGGCACCACC	GPRopt
361	I__F__H__P__L__L__Y__A__F__T__R__Q__K__F__Q__K__V__L__K__S__	Protein
1081	ATATTTACCCCTCTATTATATGCATTCACTAGACAAAAATTTCAAAGGTCTTGAAAAGT	GPR22
1081	ATCTTCCACCCCTGCTGTACGCCTTCACCCGGCAGAAATTCAGAAGGTGCTGAAGTCC	GPRopt
381	K__M__K__K__R__V__V__S__I__V__E__A__D__P__L__P__N__N__A__V__	Protein
1141	AAAATGAAAAAGCGAGTTGTTTCTATAGTAGAAGCTGATCCCCTGCCTAATAATGCTGTA	GPR22
1141	AAGATGAAGAAACGGGTGGTGTCCATCGTGAAGCCGACCCCTGCCCAACAACGCCGTG	GPRopt
401	I__H__N__S__W__I__D__P__K__R__N__K__K__I__T__F__E__D__S__E__	Protein
1201	ATACACAACCTCTTGATAGATCCTAAAAGAAACAAAAAATTACCTTTGAAGATAGTGAA	GPR22
1201	ATCCACAACAGCTGGATCGACCCCAAGCGGAACAAGAAGATCACCTTCGAGGACAGCGAG	GPRopt

```
421  I _ R _ E _ K _ C _ L _ V _ P _ Q _ V _ V _ T _ D _ _ * _ _ Protein
1261 ATAAGAGAAAAATGTTTAGTGCCTCAGGTTGTCACAGACTAG GPR22
1261 ATCCGCGAGAAGTGCCTGGTGCCTCAGGTGGTGACAGACTGA GPRopt
```

**Abbildung 58: Alignment der Protein-codierenden cDNA-Sequenzen von GPR22 und GPRopt mit der Proteinsequenz.**

Das Alignment wurde mit Hilfe von <http://nadv.herokuapp.com/> erstellt.

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure (C20:4 n-6)
AF	<i>atrial fibrillation</i> , Vorhofflimmern
ALA	alpha-Linolensäure (C18:3 n-3)
cAMP	<i>cyclic adenosin monophosphate</i> , zyklisches AMP
cGMP	<i>cyclic guanoisn monophosphate</i> , zyklisches GMP
COX	Cyclooxygenase
Cx43	Connexin 43
CYP	Cytochrom P450
DHA	Docosahexaensäure (C22:6 n-3)
DHDP	Dihydroxydocosapentaensäure
DHEQ	Dihydroxyeicosatetraensäure
DHET	Dihydroxyeicosatriensäure
DPA	Docosapentaensäure (C22:5 n-6 und n-3)
EDP	Epoxyeicosadocosapentaensäure
EEQ	Epoxyeicosatetraensäure
EET	Epoxyeicosatriensäure
EPA	Eicosapentaensäure (C20:5 n-3)
FS	Fettsäure
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> , G-Protein gekoppelter Rezeptor
HDHA	Hydroxydocosahexaensäure
HEPE	Hydroxyeicosapentaensäure
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i> , Hochdruckflüssigchromatigraphie
LA	Linolsäure (C18:2 n-6)
LOX	Lipoxygenase
LTCC	L-Typ Kalzium-Kanal
mK <sub>ATP</sub> -Kanal	mitochondrialer ATP-sensitiver Kalium-Kanal

NRKMs	Neonatale Rattenkardiomyozyten
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA2	Phospholipase A2
sEH	<i>soluble Epoxide Hydrolase</i> , lösliche Epoxidhydrolase
SERBP-1	<i>sterol regulatory element-binding protein</i> , Sterolregulierendes Element bindendes Protein
VF	<i>ventricular fibrillation</i> , Kammerflimmern



## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: BIOSYNTHESEWEG LANGKETTIGER N-6 UND N-3 PUFAS IN SÄUGERN. ....	2
ABBILDUNG 2: DIE DREI WEGE DER ARACHIDONSÄURE-KASKADE. ....	7
ABBILDUNG 3: CYTOCHROM P450 (CYP)-ABHÄNGIGER N-6 BZW. N-3 PUFA METABOLISMUS. ....	11
ABBILDUNG 4: PMA-VEKTOR MIT CONDON-OPTIMIERTER SEQUENZ VON GPR22 (GPROPT). ....	34
ABBILDUNG 5: OLIGONUKLEOTID MIT MELITTINSIGNALSEQUENZ. ....	35
ABBILDUNG 6: PMA-VEKTOR MIT MELITTIN-SIGNALSEQUENZ UND ENTSPRECHENDEN ÜBERGANG ZUR GPROPT- SEQUENZ. ....	36
ABBILDUNG 7: OLIGONUKLEOTID MIT 6x HisTAG. ....	36
ABBILDUNG 8: EINGEFÜGTES 6x HisTAG AM 3'-ENDE DER GPROPT-SEQUENZ. ....	37
ABBILDUNG 9: VERWENDETE KLONIERUNGSVEKTOREN. ....	38
ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES STUDIENDESIGNS. ....	52
ABBILDUNG 11: VERÄNDERUNG DES OMEGA-3 INDEX UND INDIVIDUELLE DOSISEFFEKTE AUF DEN OMEGA-3 INDEX NACH OMACOR®-GABE. ....	54
ABBILDUNG 12: VERÄNDERUNG IM FETTSÄUREPROFIL. ....	55
ABBILDUNG 13: EINFLUSS DER OMACOR®-GABE AUF DEN CYP-EICOSANOINDEX (A) UND DIE PLASMAKONZENTRATION AA-, EPA- UND DHA-ABGELEITETER CYP-EICOSANOIDE (B). ....	57
ABBILDUNG 14: EFFEKT DER OMACOR®-GABE AUF DIE BILDUNG DER VON AA-, EPA- UND DHA- ABGELEITETEN REGIOISOMEREN EPOXYMETABOLITEN. ....	58
ABBILDUNG 15: VERGLEICH AUSGEWÄHLTER REGIOISOMERER EPOXYMETABOLITE. ....	59
ABBILDUNG 16: RELATIVE EFFIZIENZ IM UMSATZ DER VORLÄUFERFETTSÄUREN ZU EPOXYMETABOLITEN UND DEREN DIOLEN. ....	60
ABBILDUNG 17: EINFLUSS DER OMACOR®-GABE AUF DAS CYP-EICOSANOINDEX IM URIN. ....	61
ABBILDUNG 18: EINFLUSS DER OMACOR®-GABE AUF DAS COX-ABHÄNGIGE EICOSANOINDEX. ....	62
ABBILDUNG 19: EINFLUSS DER OMACOR®-GABE AUF DAS LOX-ABHÄNGIGE EICOSANOINDEX. ....	63
ABBILDUNG 20: EINFLUSS DER OMACOR®-GABE AUF DIE BILDUNG VON 18-HEPE. ....	64
ABBILDUNG 21: EINFLUSS DER OMACOR®-GABE AUF DEN BLUTDRUCK. ....	64
ABBILDUNG 22: EINFLUSS DER OMACOR®-GABE AUF PLASMATRIGLYZERIDE. ....	65
ABBILDUNG 23: BIOLOGISCHE WIRKUNG VON EPA UND 17,18-EEQ AUF NRKMS BEI STEIGENDER EXTRAZELLULÄRE KALZIUMKONZENTRATION. ....	67
ABBILDUNG 24: 17,18-EEQ REDUZIERT DEN EFFEKT B-ADRENERGER STIMULATION IN NRKMS. ....	68
ABBILDUNG 25: STRUKTUR DES NATÜRLICHEN EPA-METABOLITEN 17,18-EEQ. ....	68
ABBILDUNG 26: DIE BIOLOGISCHE AKTIVITÄT VON 17,18-EEQ IST ABHÄNGIG VON DER STEREOCHEMIE DES METABOLITEN. ....	69
ABBILDUNG 27: EPA, 17,18-EEQ UND EIN SYNTHETISCHER AGONIST VON 17,18-EEQ (ANALOG 2) VERWENDEN DIE GLEICHEN SIGNALWEGE. ....	73
ABBILDUNG 28: ROLLE VON GAI-PROTEIN GEKOPPELTEN REZEPTOREN IN DER VERMITTLUNG DES 17,18-EEQ EFFEKTS. ....	75
ABBILDUNG 29: PHYLOGENETISCHER STAMMBAUM DES REZEPTORKANDIDATEN GPR22. ....	77
ABBILDUNG 30: ANALYSE DER GEWEBESPEZIFISCHEN GPR22-EXPRESSION MITTELS QRT-PCR. ....	77
ABBILDUNG 31: GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION VON GPR22 IN DER RATTE. ....	78
ABBILDUNG 32: NACHWEIS DER GPR22-PROTEINEXPRESSION IN NEONATALEN UND ADULTEN RATTENHERZEN SOWIE IN PRÄPARIERTEN NEONATALEN RATTENKARDIOMYOZYTEN (NRKMS). ....	78
ABBILDUNG 33: 17,18-EEQ-EFFEKT AUF NRKMS IST GPR22-VERMITTELT. ....	79
ABBILDUNG 34: ABLAUSCHHEMA ZUR KLONIERUNG DES POTENTIELLEN REZEPTORKANDIDATEN. ....	80

ABBILDUNG 35: MELITTINSIGNALSEQUENZ MIT ÜBERGANG ZUR GPROPT-SEQUENZ.....	81
ABBILDUNG 36: KOLONIERUNGSSTRATEGIE ZUM EINBRINGEN EINER MELITTIN-SIGNALSEQUENZ IN DEN GPROPT-TRAGENDEN PMA-VEKTOR.....	81
ABBILDUNG 37: TESTSPALTUNG DES PMA-VEKTORS MIT GPROPT- UND MELITTINSEQUENZ .....	82
ABBILDUNG 38: KOLONIERUNGSSTRATEGIE ZUM EINBRINGEN DES 6X HIS TAGS IN DEN GPROPT- UND MELITTINSEQUENZ TRAGENDEN PMA-VEKTOR.....	83
ABBILDUNG 39: GPROPT-, MELITTINSIGNALSEQUENZ UND HIS TAG ENTHALTENDER PMA-VEKTOR NACH SPALTUNG DER PLASMIDKLONE 1 UND 2 MIT BSU36I UND BAMHI.....	83
ABBILDUNG 40: DARSTELLUNG DER ZUR GPROPT-SEQUENZ HINZUGEFÜGTEN MELITTINSIGNAL-SEQUENZ UND DEM 6X HIS TAG. ....	84
ABBILDUNG 41: KOLONIERUNGSSCHEMA ZUR UMKLONIERUNG VON *GPROPT* IN DEN TRANSFERVEKTOR POET2 FÜR EINE INSEKTENZELLEXPRESSION. ....	85
ABBILDUNG 42: TESTSPALTUNG VON POET2 MIT *GPROPT* MIT DEN RESTRIKTIONSENZYMEN XHOI UND BAMHI .....	86
ABBILDUNG 43: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES FLASHBAC-SYSTEMS ZUR HERSTELLUNG REKOMBINANTER BACULOVIREN. ....	87
ABBILDUNG 44: WESTERN BLOT ANALYSE VON Sf9-ZELLEN NACH INFEKTION MIT GPROPT-VIRUS.....	88
ABBILDUNG 45: KONFOKALMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON GPROPT EXPRIMIERENDEN Sf9-ZELLEN. ....	89
ABBILDUNG 46: KOLONIERUNGSSCHEMA ZUR UMKLONIERUNG VON *GPROPT* IN DEN EXPRESSIONSVEKTOR PCDNA3.1(-) FÜR EINE EXPRESSION IN SÄUGERZELLEN.....	90
ABBILDUNG 47: TESTSPALTUNG VON PCDNA 3.1 (-) MIT *GPROPT* MIT DEN RESTRIKTIONSENZYMEN XHOI UND BAMHI.....	91
ABBILDUNG 48: mRNA-ANALYSE VERSCHIEDENER HEK293-KLONE NACH STABILER TRANSFEKTION MIT GPROPT.....	92
ABBILDUNG 49: KONFOKALMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON *GPROPT* EXPRIMIERENDEN HEK293- ZELLEN. ....	93
ABBILDUNG 50: PLASMAMEMBRANLOKALISIERUNG VON GPR22 IN HEK293-ZELLEN.....	94
ABBILDUNG 51: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DES OMEGA-3 INDEX .....	100
ABBILDUNG 52: DARSTELLUNG DER RELATIVEN UMSÄTZE AUS DEM VERHÄLTNIS DER VORLÄUFERFETTSÄUREN (EPA/AA) ZU DEN ENTSPRECHENDEN METABOLITEN (RATIO N-3/N-6).....	108
ABBILDUNG 53: EINFLUSS DER DOSIS- UND ZEIT-ABHÄNGIGEN EINNAHME VON N-3 PUFAS AUF KLINISCHE EREIGNISSE.....	109
ABBILDUNG 54: ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER STRUKTURFUNKTIONSANALYSE. ....	112
ABBILDUNG 55: DIE ÖFFNUNG VON K <sub>ATP</sub> -KANÄLEN IST TEIL DER 17,18-EEQ VERMITTELTEN SIGNALTRANSDUKTION. ....	114
ABBILDUNG 56: HYPOTHESENSCHEMA ZUM MÖGLICHEN MOLEKULAREN MECHANISMUS DER 17,18-EEQ WIRKUNG IN KARDIOMYOZYTEN. ....	117
ABBILDUNG 57: DIE GPR22-EXPRESSSION IST BEI HERZHYPERTROPHIE REDUZIERT. ....	119
ABBILDUNG 58: ALIGNMENT DER PROTEIN-CODIERENDEN cDNA-SEQUENZEN VON GPR22 UND GPROPT MIT DER PROTEINSEQUENZ. ....	146

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: HERZSCHÜTZENDE WIRKUNG UND MÖGLICHE MECHANISMEN VON N-3 PUFAS. ....	6
TABELLE 2: AA-METABOLISIERENDE CYP ISOFORMEN, DIE AUCH EPA UND DHA ALS ALTERNATIVE SUBSTRATE AKZEPTIEREN. ....	10
TABELLE 3: TIERMODELLE ZUR VERIFIZIERUNG DER KARDIOPROTEKTIVEN WIRKUNG VON EETs. ....	14
TABELLE 4: BEKANNTE EICOSANOID-REZEPTOREN UND KÜRZLICH NEU ENTDECKTE GPCRS. ....	18
TABELLE 5: 50 µL SPALTANSATZ ZUR LINEARISIERUNG DES PMA-VEKTORS MIT GPROPT-SEQUENZ. ....	34
TABELLE 6: ANSATZ FÜR EINE TESTSPALTUNG DES GPROPT UND MELITTINSIGNALSEQUENZ ENTHALTENEN PMA-VEKTORS ....	36
TABELLE 7: 30 µL SPALTANSATZ ZUR ÖFFNUNG DES PMA-VEKTORS, UM EINE LIGATION MIT DEM 6X HIS TAG OLIGONUKLEOTID DURCHZUFÜHREN. ....	37
TABELLE 8 ZEIGT DIE WELLENLÄNGEN DER VERWENDETEN LASER ZUR ANREGUNG DER DETEKTIONS- FLUOROCROME UND DIE ANGEWANDTEN FILTERSETS ZUR DETEKTION. ....	46
TABELLE 9: VERWENDETE siRNA-PAARE ZUR REDUKTION DER GPR22-EXPRESSION. ....	48
TABELLE 10: BASALE CHARAKTERISIERUNG DER PROBANDEN. ....	53
TABELLE 11: EFFEKT DER OMACOR®-GABE AUF DIE FETTSÄUREZUSAMMENSETZUNG ALLER STUDIEN TEILNEHMER. ....	56
TABELLE 12 CHRONOTROPE EFFEKTE VON 17,18-EEQ ANALOGA MIT PARTIELL GESÄTTIGTEN DOPPELBINDUNGEN AUF NRKMS. ....	70
TABELLE 13: CHRONOTROPE EFFEKTE VON EPOXYBIOISOSTEREN AUF NRKMS. ....	72
TABELLE 14: SPEZIFISCHE BINDUNG DER [3H]-14,15-EET ENANTIOMERE AN Sf9-ZELLEN. ....	96
TABELLE 15: SPEZIFISCHE BINDUNG DER [3H]-14,15-EET ENANTIOMERE AN HEK293-ZELLEN. ....	97

## Publikationen

**Konkel, A.**<sup>1</sup>, Fischer, R.<sup>1</sup>, Mehling, H., Blossey, K., Gapelyuk, A., Wessel, N., von Schacky, C., Dechend, R., Müller, D.N., Rothe, M., Luft, F.C., Weylandt, K., Schunck, W.H., *Dietary omega-3 fatty acids modulate the endogenous eicosanoid profile in man primarily by targeting the CYP-epoxygenase pathway*. January 2014, submitted at The Journal of Lipid Research; <sup>1</sup> **contributed equally**

Westphal, C., **Konkel, A.** and Schunck, W.H., *Cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids and their role in cardiovascular disease*. P450 eBook, December 2013, submitted

Westphal, C., **Konkel, A.** and Schunck, W.H., *CYP-eicosanoids – a new link between omega-3 fatty acids and cardiac disease?* Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2011. **96**(1-4): p. 99-108.

**Konkel, A.** and W.H. Schunck, *Role of cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids*. Biochim Biophys Acta, 2011.

Falck, J.R., Wallukat, G., Puli, N., Goli, M., Arnold, C., **Konkel, A.**, Rothe, M., Fischer, R., Müller, D.N., Schunck, W.H., *17(R),18(S)-Epoxyeicosatetraenoic acid, a potent anti-arrhythmic EPA metabolite: SAR and stable analogs*. J. Med. Chem., 2011.

Arnold, C., Markovic, M., Blossey, K., Wallukat, G., Fischer, R., Dechend, R., **Konkel, A.**, von Schacky, C., Luft, F.C., Müller, D.N., Rothe, M., Schunck, W.H., *Arachidonic Acid-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes Are Targets of Omega-3 Fatty Acids*. J Biol Chem, 2010.

Arnold, C., **Konkel, A.**, Fischer, R., Schunck, W.H., *Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids*. Pharmacol Rep, 2010. **62**(3): p. 536-47.

## Vortrag

Wollenberger Seminar, MDC Berlin-Buch, August 2013

„Dietary omega-3 fatty acids modulate the lipid mediator profile in man“

## Posterbeiträge

65th High Blood Pressure Research Conference, Washington D.C., USA (10/2012); **Anne Konkel**, Robert Fischer, H. Mehling, Clemens von Schacky, Michael Rothe, Wolf-Hagen Schunck; *Dietary omega-3 fatty acid supplementation shifts the endogenous CYP-eicosanoid profil in men*

14th Winter Eicosanoid Conference, Baltimore, Maryland, USA (03/2012); Christina Westphal, **Anne Konkel**, Bastian Spallek, M. Adeniyi, Gerd Wallukat, Dominik N. Müller, Robert Fischer, John R. Falck, Wolf-Hagen Schunck; *Anti-arrhythmic properties of CYP-epoxyeicosanoid derived from omega-3 fatty acids*

35th Anniversary of the INTERNATIONAL SCHOOL OF PHARMACOLOGY, Course: Eicosanoids in cardiovascular diseases (06/2011); **Anne Konkel**, Christina Westphal,

Bastian Spallek, Gerd Wallukat, Derryl C. Zeldin, John R. Falck, Dominik N. Müller, Robert Fischer, Wolf-Hagen Schunck; *CYP-epoxyeicosanoids in sex-specific mechanisms of cardiac hypertrophy*

13th Winter Eicosanoid Conference, Baltimore, Maryland, USA (03/2011); Christina Westphal, **Anne Konkkel**, Bastian Spallek, Gerd Wallukat, Derryl C. Zeldin, John R. Falck, Dominik N. Müller, Robert Fischer, Wolf-Hagen Schunck; *Cardiomyocyte-specific overexpression of CYP2J2 protects against cardiac hypertrophy*

12th Joint MDC/FMP/HRS PhD Retreat, Rheinsberg (11/2010), **Anne Konkkel**, Christina Westphal, Lajos Marko, L.M. DeGraf, Carola Schubert, Bastian Spallek, Robert Fischer, A. Bradbury, Ralf Dechend, Friedrich C. Luft, Vera Regitz-Zagrosek, Derryl C. Zeldin, Dominik N. Müller, Wolf-Hagen Schunck; *CYP2J2 overexpression improves cardiac hypertrophy in male, but not in female mice*

64th High Blood Pressure Research Conference, Washington D.C., USA (10/2010), Bastian Spallek, **Anne Konkkel**, Christina Westphal, Lajos Marko, L.M. DeGraf, Carola Schubert, A. Bradbury, Ralf Dechend, Friedrich C. Luft, Vera Regitz-Zagrosek, Derryl C. Zeldin, Dominik N. Müller, Wolf-Hagen Schunck, Robert Fischer; *CYP2J2 overexpression protects against arrhythmias in two different models of cardiac hypertrophy*

12th Winter Eicosanoid Conference, Baltimore, Maryland, USA (03/2010); **Anne Konkkel**, Christina Westphal, Lajos Marko, L.M. DeGraf, Carola Schubert, Bastian Spallek, Robert Fischer, A. Bradbury, Ralf Dechend, Friedrich C. Luft, Vera Regitz-Zagrosek, Derryl C. Zeldin, Dominik N. Müller, Wolf-Hagen Schunck; *CYP2J2 overexpression improves cardiac hypertrophy in male, but not in female mice*

33. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V., Lübeck (11/2009); **Anne Konkkel**, Cosima Schmidt, Narender Puli, Gerd Wallukat, Robert Fischer, Friedrich C. Luft, John R. Falck, Wolf-Hagen Schunck; *Anti-arrhythmic metabolites derived from omega-3 fatty acids*

63rd High Blood Pressure Research Conference, Chicago, USA (09/2009); Cosima Schmidt, Michael Rothe, Katrin Rosenkranz, **Anne Konkkel**, Friedrich C. Luft, Dominik N. Müller, Wolf-Hagen Schunck; *Tissue-specific modulation of the endogenous CYP-eicosanoid profile by dietary omega-3 fatty acids*

11th Winter Eicosanoid Conference, Baltimore, Maryland, USA (03/2009); Cosima Schmidt, Narender Puli, Gerd Wallukat, Robert Fischer, **Anne Konkkel**, Dominik N. Müller, John R. Falck, Wolf-Hagen Schunck; *Anti-arrhythmic omega-3 metabolites: structure-activity relationship and development of stable analogs*

## Danksagung

Prof. Dr. Andreas Herrmann danke ich für die Annahme meiner Doktorarbeit im Fach Biologie der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt Universität zu Berlin sowie für seine freundliche Betreuung und die Begutachtung meiner Arbeit.

Weiterhin danke ich PD Dr. Dominik N. Müller für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit. Sein stetes Interesse an meiner Arbeit und die vielen hilfreichen fachlichen Diskussionen haben mich stets motiviert und mein Fortkommen maßgeblich gefördert. Ich habe in jeder Hinsicht volle Unterstützung erhalten, wofür ich sehr dankbar bin. Nicht zuletzt fand ich die freundliche Atmosphäre, in der geforscht und diskutiert wurde, sehr angenehm.

Ich danke PD Dr. Ralph Menzel für den fachlichen Austausch und die Bereitschaft meine Arbeit zu begutachten.

Im Besonderen danke ich Dr. Wolf-Hagen Schunck für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Sein enormes Fachwissen, welches er stets mit allen geteilt hat, seine Offenheit und seine geduldige Art haben mich während meiner Doktorarbeit immer aufs Neue beeindruckt und geprägt. Besonders danke ich ihm für sein mir entgegengebrachtes Vertrauen, welches es mir immer ermöglichte neue Aufgabenfelder zu erschließen und mich weiter zu entwickeln. Ich bin dankbar für eine Arbeit in diesem sehr freundlichen Umfeld und die vielfältige Förderung, die ich durch die Arbeitsgruppe Schunck erhalten habe.

Außerdem möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schunck danken, ohne deren Hilfe die vorliegende Arbeit so nicht zustande gekommen wäre:

Ramona Zummach danke ich für ihre kompetente und zuverlässige Arbeit in der Zellkultur, die Durchführung von Klonierungen und Western blots mit unserem Lieblingsprotein und diversen Assays mit Pipettiermarathon. Tausendfachen Dank!

Christel Andréé danke ich für die tatkräftige Unterstützung in dem Versuch eine KO-Maus zu generieren.

Chris Westphal danke ich ganz einfach für alles: fürs Zuhören, fürs Diskutieren, fürs Mut zusprechen, für die Korrekturen meines Manuskripts und für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ebenfalls danke ich Cosima Arnold, die mich gerade in meiner Anfangszeit der Doktorarbeit sehr unterstützt hat.

Außerdem danke ich Robert Fischer und Karen Uhlmann für die Unterstützung in der Abschlussphase meiner Doktorarbeit.

Herzlich danken möchte ich auch meinen lieben Kollegen Tim Wesser, Philipp Westphal, Max Blum und Michael Oechsner.

## **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

---

Ort, Datum

---

Anne Konkel